

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA BRENNER BUSCH

**SOROPREVALÊNCIA E ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E
Toxoplasma gondii EM SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE
INFECTADOS**

CURITIBA

2015

ANA PAULA BRENNER BUSCH

**SOROPREVALÊNCIA E ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E
Toxoplasma gondii EM SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE
INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosangela Locatelli
Dittrich

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius Ferrari

CURITIBA

2015

B977 Busch, Ana Paula Brenner
Soroprevalência e isolamento de *Neospora caninum* e
Toxoplasma gondii em sêmen de touros naturalmente infectados /
Ana Paula Brenner Busch. Curitiba: 2015.
124 f.; il.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós - Graduação em
Ciências Veterinárias.

1. Neosporose bovina. 2. Toxoplasmose em bovino.
3. Soroprevalência. I. Dittrich, Rosangela Locatelli. II. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós -
Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619:636.2

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“SOROPREVALÊNCIA E ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE INFECTADOS”** apresentada pela Mestranda **ANA PAULA BRENNER BUSCH** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APROVADA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 23 de março de 2015

Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena
Membro

Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Membro

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por todas as vezes que me conforta em minhas orações.

Aos meus pais **Pedro Busch Neto** e **Edimara Brenner Busch** pelo incentivo e educação que me dedicaram sempre, obrigada pelo carinho e amor nas horas que o cansaço era grande. Aos meus irmãos **Maria Elisa Brenner Busch** e **Pedro Henrique Brenner Busch** e minha cunhada **Larissa L. R. B. Busch** que sempre torceram para que tudo desse certo, obrigada pelo apoio constante.

Ao meu companheiro **André Saldanha Becker** por entender minha ausência por vários finais de semana e feriados, pelos conselhos, carinho e amor, muito obrigada.

Aos alunos de Iniciação Científica **José Eduardo R. R. Silva** e **Luiz Felipe S. Weber** que foram meu braço direito e esquerdo durante o projeto e compartilharam as horas e horas de preparo, coletas, análises, seja durante a aula, depois das aulas, até de madrugada, ou nos finais de semana e feriados, meu sincero agradecimento pela amizade, companheirismo e dedicação.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a **Rosangela Locatelli Dittrich** pela confiança no meu trabalho, oportunidade de compor sua equipe, pela amizade e ensinamentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Marcos Vinicius Ferrari**, por todas as oportunidades que me proporcionou, pela confiança no meu trabalho, pela amizade e ensinamentos.

Ao meu Diretor Prof. Dr. **Ivan Roque de Barros Filho** por apoiar e entender a importância da realização deste projeto.

À Prof.^a Dr.^a **Hilda Fátima de Jesus Pena** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP pelas análises da PCR e genotipagem e pela oportunidade de conhecer o Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) e sua equipe.

Aos amigos **Milena Toporovicz Silva, Jorge Henrique Carneiro e Claudio Oliver** pela amizade e franqueza de sempre e pela revisão deste trabalho, muito obrigada.

A Médica Veterinária **Marília de Oliveira Koch** que me ensinou os passos da RIFI, cultivo celular e PCR com muita paciência, obrigada pela parceria.

A Médica Veterinária **Nelia R. de Geus Menarin** que me auxiliou nas coletas de sêmen e abriu as portas das propriedades de seus colegas, obrigada pela confiança e oportunidade.

As Médicas Veterinárias **Andréa Meirelles, Kamila Alcalá, Júlia Dall’Anese** pela amizade e conselhos, ajudando a ir em frente apesar do desafio de seguir trabalhando e também realizar esse projeto.

A todos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR, em especial **Olair Beltrame, Carlos Kroetz, Rafael Hagi, Frederico Vaz, Luciane Laskoski, Fabiana Tieme, Harald Brito** pela amizade e apoio.

Aos **produtores rurais** que me receberam muito bem em suas propriedades e que disponibilizaram seus animais, seu tempo e confiança neste trabalho. Para o bem-estar dos animais e desenvolvimento de saúde animal e humana que todos os esforços foram direcionados.

RESUMO

A neosporose e a toxoplasmose são doenças abortivas causadas por protozoários, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, respectivamente. Possuem distribuição mundial. A neosporose causa impacto econômico na bovinocultura e a toxoplasmose é uma zoonose. O objetivo do trabalho foi verificar a soroprevalência para *N. caninum* e *T. gondii* em touros e isolar os agentes de amostras de sêmen de touros naturalmente infectados. No presente estudo, foram avaliados 108 touros de 14 propriedades localizadas nas mesorregiões Centro-Oriental (seis) e Metropolitana de Curitiba (seis), no Paraná, e mesorregião Serrana de Santa Catarina (duas). Os touros eram de diferentes raças e idades, criados para a reprodução em monta natural. O sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante. No soro foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI, título de 1:50). Comparou-se a soroprevalência e os dados do rebanho: idade, raça, aptidão, presença de aborto, presença de cães livres (*N. caninum*) e presença de gatos livres (*T. gondii*), por teste do Qui-Quadrado ($p=0,05$). Em 15 touros de uma das propriedades foram realizadas, aleatoriamente, coletas pareadas de sangue (tubos sem anticoagulante) e sêmen (eletro ejaculação). No sêmen foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers*: Np21/Np6 (*N. caninum*); TOX4/TOX5 (*T. gondii*); e ITS2/ITS5 (ambos). Alíquotas de sêmen foram inoculadas em células Vero para o isolamento. Nos isolados do cultivo celular a PCR foi realizada como no sêmen, porém em quatro isolados também foram realizadas a PCR da região NC5-plus (*N. caninum*) e *nested*-PCR da região B1 (*T. gondii*). A soroprevalência foi de 14,8% para *N. caninum* e 38,9% para *T. gondii*. Não houve associação de raça, aptidão, idade e presença de hospedeiro definitivo com a soroprevalência para *N. caninum* ou *T. gondii*. Houve associação significativa da ocorrência de aborto em propriedades com touros soropositivos para *N. caninum*. Na PCR as amostras de sêmen foram negativas para *N. caninum* e para *T. gondii*. No cultivo celular, quatro amostras apresentaram efeito citopático, taquizoítas e infecção de 90 a 100% da monocamada em 30 a 45 dias. Os quatro isolados foram positivos para *N. caninum* e *T. gondii* nas análises da PCR. Pode-se concluir que, na região do estudo, a ocorrência de toxoplasmose em touros é maior que a neosporose. As doenças ocorrem em todas as idades e diferentes raças, independente da aptidão da raça. A ocorrência de neosporose e de toxoplasmose independe da presença do hospedeiro definitivo na propriedade. O aborto é sinal clínico associado com a presença de touros soropositivos para *N. caninum*. O *N. caninum* e *T. gondii* são eliminados viáveis no sêmen de touros naturalmente infectados. Este é o primeiro isolado de *N. caninum* e *T. gondii* a partir de sêmen de touros naturalmente infectados.

Palavras-chaves: bovino, cultivo celular, PCR, RIFI.

ABSTRACT

The neosporosis and toxoplasmosis are abortive diseases caused by protozoan *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, respectively. They are distributed worldwide. Neosporosis causes economic impact on cattle and toxoplasmosis is a zoonosis. The aim of this study was to check the seroprevalence of *N. caninum* and *T. gondii* infection in bulls and isolate the agents of semen samples from naturally infected bulls. The present study evaluated 108 bulls of 14 properties located in East-Central (six) and Metropolitan of Curitiba (six), Regions of Paraná and Serrana Region of Santa Catarina (two). The bulls were of different races and ages, created for reproduction in natural breeding. Blood was collected in tubes without anticoagulant. In serum, the search of anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* antibodies was performed by indirect immunofluorescence assay (IFA, title 1:50). The seroprevalence was compared with herd data: age, race, ability, abortion occurrence, presence of free dogs (*N. caninum*) and presence of free cats (*T. gondii*), by chi-square ($p=0.05$). At the farm, researches conducted randomly paired samples of blood (tubes without anticoagulant) and semen (electroejaculation) in 15 bulls. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in semen with primers: Np21/Np6 (*N. caninum*); TOX4/TOX5 (*T. gondii*); and ITS2/ITS5 (both). Aliquots of semen were also inoculated on Vero cells culture for isolation. In culture samples, besides previous primers used in semen, in four samples, researches used a PCR from NC5 region of *N. caninum* DNA and B1 region of *T. gondii* DNA. The seroprevalence was 14.8% (16/108) for *N. caninum* and 38.9% (42/108) for *T. gondii*. There was no association of race, ability, age or presence of definitive host with the seroprevalence of *N. caninum* or *T. gondii*. There was a significant association between the occurrence of abortion in properties with seropositive bulls for *N. caninum*. Semen samples were negative for *N. caninum* and *T. gondii* at PCR. Four samples in cell culture had cytopathic effect, free tachyzoites and 90 to 100% monolayer infected at 30 to 45 days post inoculated. Four cell culture isolates were positive for *N. caninum* and *T. gondii* in PCR assays. It can be concluded that, in the regions studied, the occurrence of toxoplasmosis in bulls is greater than neosporosis. Diseases occur in all ages among different races, regardless of race ability. The occurrence of neosporosis and toxoplasmosis is independent of the presence of the definitive host in the farm. Abortion is a clinical sign associated with the presence of seropositive bulls for *N. caninum*. These results show viable eliminated *N. caninum* and *T. gondii* in semen of naturally infected bulls. This is the first isolate of *N. caninum* and *T. gondii* from semen of naturally infected bulls.

Keywords: bovine, cell culture, PCR, IFA.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: NEOSPOROSE EM BOVINOS

Figura 1: Ciclo de vida de *Neospora caninum*. O ciclo completo inclui a replicação sexuada (nos hospedeiros definitivos canídeos) e assexuada no hospedeiro intermediário (ex: bovino). A transmissão horizontal (pós-natal) ocorre geralmente via oocistos esporulados ou cistos teciduais. Os canídeos são infectados por ingestão de carne contaminada. Os oocistos são excretados e persistem no ambiente por período de tempo desconhecido. O hospedeiro intermediário se infecta por ingestão de pasto e água contaminada com as fezes ou ingerindo cistos teciduais. O hospedeiro intermediário não excreta os oocistos. Na transmissão vertical (ou transplacentária) os taquizoítas podem ser transmitidos congenitamente da mãe para o feto, via placenta. **Fonte:** GOODSWEN, *et al* (2013).....12

CAPÍTULO II: TOXOPLASMOSE EM BOVINOS

Figura 1: Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Transmissão horizontal: o gato se infecta por cistos teciduais e nele ocorre a replicação sexuada, com eliminação de oocistos pelas fezes. O hospedeiro intermediário ingere os oocistos esporulados com água e alimento contaminados. Transmissão vertical: os taquizoítas replicam-se no hospedeiro intermediário e podem ser transmitidos da mãe pelo feto via transplacentária. **Fonte:** DUBEY e LINDSAY (2006).....30

CAPÍTULO III: SOROPREVALÊNCIA DE NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM TOUROS DESTINADOS A MONTA NATURAL NO PARANÁ E SANTA CATARINA, BRASIL, E ASSOCIAÇÃO COM POSSÍVEIS FATORES DE RISCO

Figura 1: Soroprevalência e titulação de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em touros destinados a monta natural.....48

CAPÍTULO IV: ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* DE AMOSTRAS DE SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE INFECTADOS

Figura 1: PCR dos isolados obtidos de cultivo celular a partir de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, naturalmente infectados por *N. caninum*.72

Figura 2: PCR do isolado em cultivo celular a partir de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, naturalmente infectados por *T. gondii*.....74

Figura 3: Padrão de infecção de *N. caninum* e *T. gondii* no cultivo celular a partir de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, soropositivos para *N. caninum* e *T. gondii* (A, B, C, D, E). F: Amostra negativa no cultivo celular de sêmen de touro.....78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III: SOROPREVALÊNCIA DE NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM TOUROS DESTINADOS A MONTA NATURAL NO PARANÁ E SANTA CATARINA, BRASIL, E ASSOCIAÇÃO COM POSSÍVEIS FATORES DE RISCO

Tabela 1: Correlação da soropositividade para *N. caninum* e *T. gondii* de touros destinados à monta natural com as características do rebanho.....49

CAPÍTULO IV: ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* DE AMOSTRAS DE SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE INFECTADOS

Tabela 1: Resultados dos exames sorológicos e título de anticorpos para *N. caninum*, isolamento *in vitro* e pesquisa de DNA de *N. caninum* no sêmen íntegro e no isolado de sêmen de touros destinados à reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná.....72

Tabela 2: Resultados dos exames sorológicos e título de anticorpos para *T. gondii*, isolamento *in vitro* e pesquisa de DNA de *T. gondii* no sêmen íntegro e no isolado de sêmen de touros destinados à reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná.....74

Tabela 3: Resultado dos exames sorológicos (RIFI), do isolamento em cultivo celular do sêmen e da PCR do cultivo celular de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, naturalmente infectados por *N. caninum* e *T. gondii*.....75

Tabela 4: Tempo, em dias após a inoculação, do aparecimento de alterações na monocamada de células Vero dos isolados de sêmen de touros naturalmente infectados.....77

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	menor que
>	maior que
®	marca registrada
°C	grau centígrado
µg	micrograma(s)
µL	microlitro(s)
µM	Micromolar
µm	Micrômetro(s)
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
CIA	centrais de inseminação artificial
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	e colaboradores
ex	por exemplo
G (g)	Força Centrífuga
H	hora(s)
HCl	ácido clorídrico
HD	hospedeiro definitivo
HI	hospedeiro intermediário
le	isto é
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	imunohistoquímica
Kb	Kilobases
KCl	cloreto de potássio
mg	miligrama(s)
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)

mM	Milimolar
MS	Mato Grosso do Sul
n/a	amostra não avaliada
NaCl	cloreto de sódio
neg	Negativo
ng	nanograma(s)
nm	Nanômetro
nPCR	<i>nested</i> -PCR
p.i.	pós-inoculação
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	concentração de hidrogênio iônico
pmol	picomol(s)
PR	Paraná
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossômico
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
SC	Santa Catarina
SCA	Setor de Ciências Agrárias
seg	segundo(s)
SP	São Paulo
T1	data da triagem (sangue)
T2	data da coleta de sêmen pareada com nova coleta de sangue
Taq	<i>Thermophillus aquaticus</i>
Tris	hidroximetilaminometano
™	"trade mark"
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UI	unidade(s) internacional(is)
UV	Ultravioleta
x ²	qui-quadrado

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências bibliográficas	4
CAPÍTULO I: NEOSPOROSE EM BOVINOS.....	8
Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
Classificação do parasito.....	11
Ciclo e hospedeiros	11
Vias de transmissão de <i>N. caninum</i>	13
Sinais clínicos da neosporose em bovinos.....	15
Diagnóstico de <i>N. caninum</i>	15
Distribuição de <i>N. caninum</i>	16
<i>N. caninum</i> em touros e suas implicações na transmissão do parasita	17
Referências bibliográficas	21
CAPÍTULO II: TOXOPLASMOSE EM BOVINOS	26
Resumo	27
Abstract	28
Introdução	29
Classificação do parasito.....	29
Ciclo e hospedeiros	29
Vias de transmissão de <i>T. gondii</i>	32
Sinais clínicos da toxoplasmose	33
Diagnóstico de <i>T. gondii</i>	34
Distribuição de <i>T. gondii</i>	35
Detecção de <i>T. gondii</i> em sêmen e suas implicações na transmissão do parasita.....	36
Referências bibliográficas	37

CAPÍTULO III: SOROPREVALÊNCIA DE NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM TOUROS DESTINADOS A MONTA NATURAL NO PARANÁ E SANTA CATARINA, BRASIL E ASSOCIAÇÃO COM POSSÍVEIS FATORES DE RISCO

.....	42
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e métodos	46
Animais e Rebanho	47
Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	47
Análise estatística	47
Resultados	48
Discussão.....	50
Soroprevalência x raça e aptidão da raça	51
Soroprevalência x idade dos touros	51
Soroprevalência x presença do hospedeiro definitivo	52
Soroprevalência x ocorrência de abortamento na propriedade	53
Conclusões	54
Perspectivas	54
Referências bibliográficas	54

CAPÍTULO IV: ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* DE AMOSTRAS DE SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE INFECTADOS

.....	59
Resumo	60
Abstract	61
Introdução	62
Soroprevalência de neosporose e toxoplasmose no Brasil.....	63
Detecção dos parasitas no sêmen de touros e a transmissão venérea	63
Material e métodos	65
Animais.....	66
Amostras de sangue	66
Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	66
Amostras de sêmen.....	66
Isolamento em cultivo celular.....	67
Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	68
Resultados	71
<i>Neospora caninum</i>	71
<i>Toxoplasma gondii</i>	73

Coinfecção de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	75
Padrão de infecção no cultivo celular (<i>in vitro</i>) dos isolados mistos de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> a partir de sêmen de touros naturalmente infectados	76
Discussão.....	79
<i>Neospora caninum</i>	79
<i>Toxoplasma gondii</i>	82
Coinfecção de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>	83
Padrão de infecção no cultivo celular (<i>in vitro</i>) dos isolados mistos de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> a partir de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural	85
Conclusões	86
Perspectivas	86
Referências bibliográficas	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

INTRODUÇÃO GERAL

A neosporose e a toxoplasmose são doenças que causam abortamento e seus agentes etiológicos são os protozoários *Neospora caninum* e o *Toxoplasma gondii*, respectivamente. A neosporose tem importante impacto econômico na bovinocultura e a toxoplasmose é uma zoonose.

Esses agentes são parasitas intracelulares obrigatórios e sua distribuição é mundial. O cão, o coioote, o dingo e o lobo cinza são os hospedeiros definitivos do *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988; GONDIM *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2010; DUBEY *et al.*, 2011), enquanto que os felídeos, principalmente o gato doméstico, são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2012).

O ciclo biológico dos parasitas é semelhante, sendo os oocistos eliminados apenas pelo hospedeiro definitivo, onde ocorre a multiplicação da forma sexuada. Nos hospedeiros intermediários (mamíferos e aves) a multiplicação ocorre de forma assexuada pela replicação de taquizoítas e bradizoítas. O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir cistos teciduais contendo os bradizoítas nos hospedeiros intermediários e também pela ingestão de oocistos. Os hospedeiros intermediários se infectam pela ingestão de oocistos e também pela via transplacentária (DUBEY e LINDSAY, 2006; GOODSWEN *et al.*, 2013).

As vias de transmissão destes parasitos são as vias horizontal ou tardia e vertical ou congênita. A transmissão horizontal ocorre quando o hospedeiro definitivo ingere cistos teciduais ao se alimentar do hospedeiro intermediário contaminado. Após a reprodução sexuada dos parasitas no hospedeiro definitivo, esses são eliminados na forma de oocistos pelas fezes. Os oocistos esporulam no ambiente e o hospedeiro intermediário os ingere com água ou alimentos contaminados, tornando-se infectado. A transmissão vertical ocorre com a reprodução assexuada dos taquizoítas nos hospedeiros os quais passam da mãe para os fetos via placenta (DUBEY e LINDSAY, 2006; GOODSWEN *et al.*, 2013).

A toxoplasmose é altamente prevalente em seres humanos e animais no Brasil, inclusive no Paraná. Essa doença acomete principalmente ovinos e caprinos. Também ocorre em bovinos, sendo a soroprevalência no país de 3%

a 71% (DUBEY *et al.*, 2012). A soroprevalência para *T. gondii* no Paraná foi de 20,9% (37/177) em bovinos (MEIRELLES *et al.*, 2014).

A neosporose é principalmente uma doença de cães e bois. É endêmica nos rebanhos bovinos no Brasil e sua soroprevalência varia de 6,7% a 91,2% dependendo da região e da aptidão do rebanho (DUBEY e SCHARES, 2011). A soroprevalência de *N. caninum* em bovinos criados no Paraná foi de 46,9% (83/177) (MEIRELLES *et al.*, 2014).

A via venérea poderia ser incluída como via de transmissão, mas é necessário verificar se os parasitas são eliminados viáveis no sêmen. Em sêmen fresco e em sêmen congelado de touros naturalmente e experimentalmente infectados, o DNA de *N. caninum* foi detectado, porém, os níveis de parasitos foram baixos e a eliminação foi intermitente. Entretanto, o isolamento do *N. caninum* por meio de bioensaios com camundongos realizado na tentativa de comprovar a viabilidade dos parasitas no sêmen destes touros não foi bem sucedido (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; PITUCO *et al.*, 2005; SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007A). Até o presente, não há relatos do isolamento de *N. caninum* de amostras de sêmen bovino.

Estudos com inseminação artificial utilizando sêmen de touro experimentalmente infectado por *N. caninum*, não foram capazes de validar a eficiência da transmissão do protozoário pela via venérea em vacas (CANADA *et al.*, 2006; SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007B). Entretanto, quando o mesmo estudo foi realizado em novilhas, comprovou-se a infecção por soroconversão persistente e detecção de DNA de *N. caninum* apenas naquelas que foi utilizado sêmen com alta carga parasitária: 5×10^5 taquizoítas (SERRANO *et al.*, 2006; SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007B). Ainda não está claro se a via venérea também ocorre em bovinos naturalmente infectados.

A detecção de DNA de *T. gondii* em machos naturalmente infectados foi realizada no sêmen de carneiros (MORAES *et al.*, 2010) e de cães (KOCH, 2014). Em estudos com machos experimentalmente infectados por *T. gondii* foi possível detectar DNA do protozoário no sêmen de: coelhos (LIU *et al.*, 2006B), cachacos (MOURA *et al.*, 2007), carneiros (LOPES *et al.*, 2009), cães (ARANTES *et al.*, 2009), ratos (TERPSIDIS *et al.*, 2009), touros (SCARPELLI *et al.*, 2009) e bodes (SANTANA *et al.*, 2010).

Em animais experimentalmente infectados o *T. gondii* foi isolado do sêmen de bodes (DUBEY e SHARMA, 1980; SANTANA *et al.*, 2010), carneiros (TEALE *et al.*, 1982; LOPES *et al.*, 2009), cachacos (MOURA *et al.*, 2007), cães (ARANTES *et al.*, 2009) e touros (SCARPELLI *et al.*, 2009).

A transmissão venérea do *T. gondii* foi comprovada em estudos experimentais em coelhos (LIU *et al.*, 2006A), ovelhas (DE MORAES *et al.*, 2010) e cabras (WANDERLEY *et al.*, 2013).

No Brasil, estudos de detecção de *N. caninum* e *T. gondii* em sêmen de touros são escassos (PITUCO *et al.*, 2005; SCARPELLI *et al.*, 2009) e não existem trabalhos no Paraná.

Considerando-se os fatores apresentados e a escassez de informações sobre a neosporose e toxoplasmose em touros destinados a reprodução em monta natural no Paraná e no Brasil, os objetivos desse estudo foram:

- Investigar a ocorrência de infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em touros destinados a reprodução em monta natural;
- Investigar possíveis fatores de risco associados à ocorrência de infecção por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em touros naturalmente infectados e destinados a reprodução em monta natural;
- Verificar a eliminação de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* viáveis em sêmen de touros naturalmente infectados.

O estudo foi realizado em amostras de soro e sêmen de touros naturalmente infectados, procedentes dos Estados do Paraná e Santa Catarina, por reação de imunofluorescência indireta (RIFI), isolamento *in vitro* (cultivo celular) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

Essa dissertação está dividida em quatro capítulos: capítulo I – “Neosporose em bovinos”; capítulo II – “Toxoplasmose em bovinos”; capítulo III – “Soroprevalência de neosporose e toxoplasmose em touros destinados a monta natural no Paraná e Santa Catarina, Brasil, e associação com possíveis fatores de risco”; e o capítulo IV – “Isolamento de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em sêmen de touros naturalmente infectados”.

Referências bibliográficas

ARANTES, T. P. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Exp Parasitol**, v. 123, n. 2, p. 190-4, Oct 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622353> >. Acesso em: 13/04/14.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1329-36, Oct 1 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325558> >. Acesso em: 05/05/13.

CANADA, N. *et al.* Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 139, n. 1-3, p. 109-14, Jun 30 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542775> >. Acesso em: 05/05/13.

DE MORAES, É. P. B. X. *et al.* Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 318-322, 6/24/ 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710000981> >. Acesso em: 20/05/14.

DUBEY, J. P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, May 1 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391851> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 9/27/ 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711003566> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776427> >. Acesso em: 25/01/15.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 22, n. 3, p. 645-71, Nov 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071358> >. Acesso em: 25/01/14.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, Aug 4 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704458> >. Acesso em: 05/05/2013.

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **Am J Vet Res**, v. 41, n. 5, p. 794-5, May 1980.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-18, Mar 15 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725454> >. Acesso em: 05/05/13.

GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 159-61, Feb 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037103> >. Acesso em: 10/02/15.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, v. 13, n. 0, p. 133-50, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985682> >. Acesso em: 05/05/13.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 945-50, Jul 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149793> >. Acesso em: 24/08/14.

KOCH, M. d. O. **Isolamento in vitro de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados**. 2014. 94pp Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1884/36301> >. Acesso em: 10/02/15.

LIU, S. G. *et al.* Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, n. 3, p. 166-70, Jun 2006a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094613> >. Acesso em: 24/08/14.

LIU, S. G. *et al.* Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with *Toxoplasma* tachyzoites. **Chin Med J (Engl)**, v. 119, n. 8, p. 701-4, Apr 20 2006b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635418> >. Acesso em: 24/08/14.

LOPES, W. D. *et al.* Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected rams (*ovis aries*). **J Parasitol Res**, v. 2009, n. Article ID 602803, p. 6, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721328> >. Acesso em: 24/08/14.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001202204&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

MORAES, É. P. B. X. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001100003&script=sci_arttext >. Acesso em: 05/05/13.

MOURA, A. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 430-434, Oct 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007001000008 >. Acesso em: 05/05/13.

ORTEGA-MORA, L. M. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 301-308, Nov 28 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637032> >. Acesso em: 05/05/13.

PITUCO, E. M. *et al.* Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. 15 a 16 setembro 2005. p.39-41.

SANTANA, L. F. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 3, p. 179-82, Jul-Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943023> >. Acesso em: 05/05/13.

SCARPELLI, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 1, p. 59-64, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000100009 >. Acesso em: 10/05/14.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v. 67, n. 6, p. 1175-84, Apr 1 2007a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316779> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 729-37, Mar 1 2007b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126895> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Vet Parasitol**, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, Feb 18 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288958> >. Acesso em: 05/05/13.

TEALE, A. J.; BLEWETT, D. A.; MILLER, J. K. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. **Vet Rec**, v. 111, n. 3, p. 53-5, Jul 17 1982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7123822> >. Acesso em: 24/08/14.

TERPSIDIS, K. I. *et al.* *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 3, p. 238-41, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19063884> >. Acesso em: 05/05/13.

WANDERLEY, F. S. *et al.* Experimental vaginal infection of goats with semen contaminated with the "CPG" strain of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 99, n. 4, p. 610-3, Aug 2013. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391103> >. Acesso em: 24/08/14.

CAPÍTULO I: NEOSPOROSE EM BOVINOS

Resumo

A neosporose é uma doença causada por protozoário *Neospora caninum*, e causa de abortamento em bovinos. Estima-se que as perdas econômicas na pecuária fiquem em torno de 2 a 5% ao ano. *N. caninum* é um parasita intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae. A neosporose não é considerada uma zoonose. Os hospedeiros definitivos de *N. caninum* são o cão, o coiote, o dingo e o lobo-cinza. O principal hospedeiro intermediário natural é o bovino, mas o *N. caninum* também foi isolado de ovelhas, búfalos, bisões, cavalos, cervo da cauda branca e cães. O ciclo biológico é caracterizado por três estágios infecciosos conhecidos: taquizoítas, cistos teciduais (contendo bradizoítas) e oocistos. O estágio ambientalmente resistente do parasito, o oocisto, é excretado nas fezes do cão na forma não esporulada. Os carnívoros tornam-se infectados pela ingestão de tecidos contendo bradizoítas e herbívoros provavelmente se infectam pela ingestão de água e comida contaminada por oocistos esporulados. A infecção transplacentária pode ocorrer quando taquizoítas são transmitidos de uma fêmea parasitada para o seu feto durante a gestação. A transmissão de *N. caninum* que ocorre após o nascimento é considerada transmissão horizontal e transmissão transplacentária é chamada de transmissão vertical ou congênita. Na maioria dos casos, bovinos adultos infectados não possuem sinais clínicos da doença e a maioria das vacas infectadas tem gestação normal. Entretanto, estas são mais susceptíveis a abortamento que vacas sadias, especialmente se a infecção ocorrer no primeiro terço da gestação. O DNA de *N. caninum* foi detectado em sêmen fresco e congelado de touros naturalmente infectados. A transmissão venérea de *N. caninum* foi comprovada por soroconversão de novilhas inseminadas com sêmen fresco infectado por taquizoítas, mas apenas em concentrações elevadas (5×10^4). Não houve soroconversão ou detecção de DNA em embriões ou bezerros nestes estudos. Entretanto, a transmissão venérea não foi possível em vacas inseminadas com sêmen congelado contaminado com $1,63 \times 10^7$ taquizoítas de *N. caninum* e nem em vacas cobertas por touros infectados com 1×10^8 taquizoítas. Até o presente, não há relatos de isolamento do *N. caninum* de sêmen de touros. Sendo assim, é necessário investigar a viabilidade de *N. caninum* em amostras de sêmen de touros naturalmente infectados para elucidar a participação dos machos na disseminação e persistência do parasita nos rebanhos.

Palavras-chave: *Neospora caninum*, sêmen, venérea.

Abstract

Neosporosis is a disease caused by the protozoan *Neospora caninum* and causes abortion in cattle. It is estimated that the economic losses in livestock remain around 2-5% per year. *N. caninum* is an obligate intracellular parasite of the Apicomplexa phylum, Sporozoea class, Eucoccidiida family and Sarcocystidae order. The neosporosis is not a zoonosis. The definitive hosts of *N. caninum* are dog, coyote, dingo and gray-wolf. The main natural intermediate host is the cattle, but *N. caninum* was also isolated from sheep, buffalo, bison, horses, white tail deer and dogs. The life cycle is characterized by three known infectious stages: tachyzoites, tissue cysts (containing bradyzoites) and oocysts. The environmentally resistant stage of the parasite, the oocyst, is excreted in dog feces in the non-spore form. Carnivores become infected by the ingestion of tissue containing bradyzoites and herbivores probably become infected by the ingestion of water and food contaminated by sporulated oocysts. The transplacental infection can occur when tachyzoites are transmitted from an infected female to her fetus during pregnancy. Transmission of *N. caninum* that occurs after birth is considered horizontal transmission while transplacental transmission is called vertical or congenital transmission. In most cases, infected adult cattle have no clinical signs of disease and most infected cows have normal pregnancy. However, these are more susceptible to abortion than healthy cows, especially if they are infected in the first trimester of gestation. The DNA of *N. caninum* was detected in fresh and frozen semen of naturally infected bulls. The venereal transmission of *N. caninum* was confirmed by seroconversion of heifers inseminated with fresh semen infected with tachyzoites, but only at high concentrations (5×10^4). There was no seroconversion or DNA detection in calves or embryo of these studies. However, venereal transmission was not possible in cows inseminated with frozen semen contaminated with 1.63×10^7 *N. caninum* tachyzoites nor in cows serviced by bulls infected with 1×10^8 tachyzoites. Until now, there are no reports of isolation of *N. caninum* in semen of bulls. Therefore, it is necessary to investigate the viability of *N. caninum* in naturally infected bull semen samples to elucidate the involvement of males in the spread and persistence of the parasite in herds.

Keywords: *Neospora caninum*, semen, venereal.

Introdução

O *Neospora caninum* é um protozoário que acomete principalmente cães e bois. O primeiro reconhecimento deste parasita foi em cães com encefalomielite e miosite na Noruega por Bjerkas *et al.* (1984), mas a sua descrição como *Neospora caninum*, gênero e espécie novos, foi realizada por Dubey *et al.* (1988) em cães com meningoencefalomielite e miosite, nos Estados Unidos.

O *N. caninum* é o principal causador de abortamentos e perdas neonatais em bovinos em vários países. Estima-se que as perdas econômicas na pecuária são em torno de 2 a 5% ao ano, mas ocasionalmente podem ultrapassar 20% (GOODSWEN *et al.*, 2013). A distribuição do parasita é mundial e já foi relatado em todos os continentes, tanto na área rural quanto urbana (DUBEY e SCHARES, 2011).

Classificação do parasito

O *N. caninum* é um parasita intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 1988). Na família Sarcocystidae, além do gênero *Neospora* também são encontrados os protozoários do gênero *Hammondia* e *Toxoplasma* (GOODSWEN *et al.*, 2013). Duas espécies são conhecidas no gênero *Neospora*: *Neospora caninum* (DUBEY *et al.*, 1988) e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1996), sendo que a primeira afeta principalmente bovinos e a segunda equinos.

Ciclo e hospedeiros

A neosporose é principalmente uma doença de bois e cães e não é considerada uma zoonose. Os hospedeiros definitivos (HD) de *N. caninum* são o cão, o coioote, o dingo e o lobo-cinza (DUBEY *et al.*, 1988; GONDIM *et al.*, 2004B; KING *et al.*, 2010; DUBEY *et al.*, 2011). O principal hospedeiro intermediário (HI) natural é o bovino, mas o *N. caninum* também foi isolado de ovelhas, búfalos,

bisões, cavalos, cervo da cauda branca e cães. O *N. caninum* já foi detectado por imunohistoquímica (IHQ) e por reação em cadeia da polimerase (PCR) em raposas, gambás, antílopes, cervo da cauda preta, lhamas, alpacas, ratos, camundongos, rinocerontes, cabras, galinhas, pardais, capivaras. Anticorpos para *N. caninum* também foram detectados em gatos domésticos, camelos e suínos (DUBEY *et al.*, 2007; DUBEY e SCHARES, 2011). A importância dos animais silvestres no ciclo da neosporose, ainda não está bem esclarecida (GONDIM, 2006; MINEO *et al.*, 2011; DUBEY *et al.*, 2014).

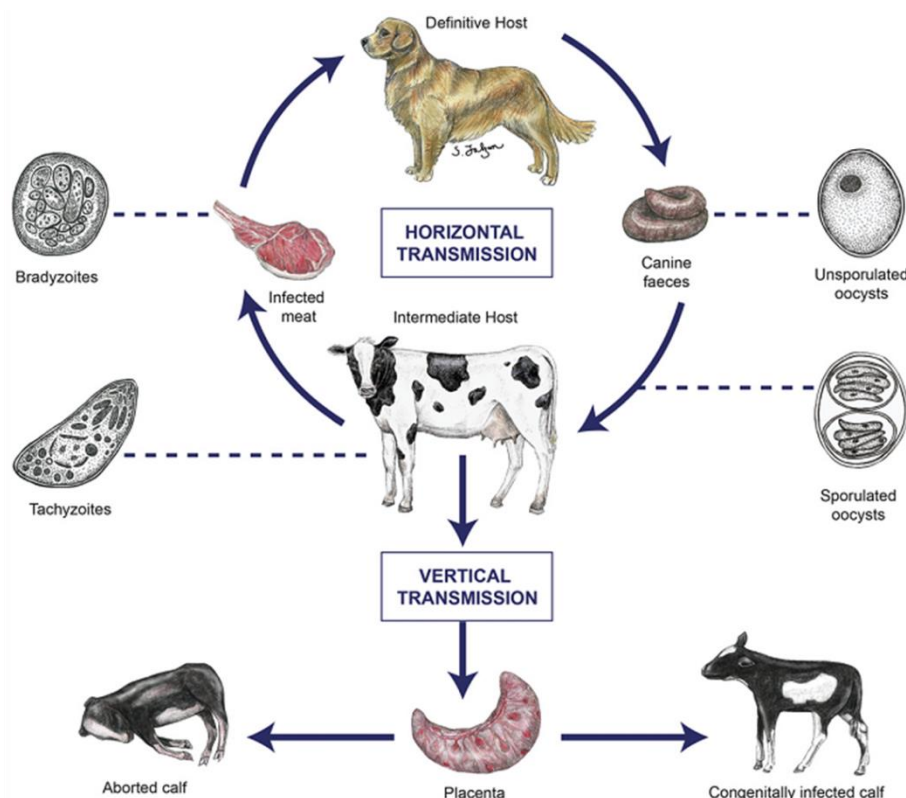


Figura 1: Ciclo de vida do *Neospora caninum*. O ciclo completo inclui a replicação sexual (nos hospedeiros definitivos canídeos) e assexuada no hospedeiro intermediário (ex: bovino). A transmissão horizontal (pós natal) ocorre geralmente via oocistos esporulados ou cistos teciduais. Os canídeos são infectados pela ingestão de carne contaminada. Os oocistos são excretados e persistem no ambiente por período de tempo desconhecido. O hospedeiro intermediário se infecta pela ingestão de pasto e água contaminada com as fezes ou ingerindo cistos teciduais. O hospedeiro intermediário não excreta os oocistos. Na transmissão vertical (ou transplacentária) os taquizoítas podem ser transmitidos congenitamente da mãe para o feto, via placenta. **Fonte:** Goodswen *et al.* (2013).

O ciclo biológico está representado na Figura 1 e é classificado por três estágios infecciosos conhecidos: taquizoítas, cistos teciduais (contendo bradizoítas) e oocistos. Os taquizoítas e os cistos teciduais são estágios encontrados nos HI e ocorrem intracelularmente. O estágio ambientalmente

resistente do parasito, o oocisto, é excretado nas fezes do HD na forma não esporulada. Todos os três estágios infecciosos do *N. caninum* estão envolvidos na transmissão do parasita. Os carnívoros tornam-se infectados pela ingestão de tecidos contendo bradizoítas e herbívoros provavelmente se infectam pela ingestão de água e comida contaminada por oocistos esporulados. A infecção transplacentária pode ocorrer quando taquizoítas são transmitidos de uma fêmea parasitada para o seu feto durante a gestação (DUBEY *et al.*, 2007).

Os oocistos são a chave da epidemiologia da neosporose. Eles são ambientalmente resistentes como os oocistos de outros coccídios (DUBEY e SCHARES, 2011). O cão elimina oocistos a partir de cinco dias após a ingestão de cistos teciduais. A frequência e o volume de eliminação são muito variáveis (DUBEY *et al.*, 2007). Porém, os taquizoítas são a principal causa da infecção aguda no hospedeiro intermediário. Eles são disseminados por sangue e sistema linfático e podem induzir resposta imune. Podem, ainda, romper a célula hospedeira pela multiplicação ativa levando a morte celular. No estágio agudo da infecção, os taquizoítas provavelmente modulam as funções celulares do hospedeiro promovendo uma oportunidade para ocorrer a doença. No estágio crônico, entretanto, os taquizoítas são alvo de destruição pelo hospedeiro e sua habilidade de estabelecer ou prolongar a doença diminui. Taquizoítas podem diferenciar-se em bradizoítas em reação a resposta imune (GOODSWEN *et al.*, 2013).

Vias de transmissão de *N. caninum*

A transmissão de *N. caninum* que ocorre após o nascimento é considerada transmissão horizontal ou tardia, enquanto que a transmissão transplacentária é chamada de transmissão vertical ou congênita (DUBEY *et al.*, 2007).

O hospedeiro intermediário mais acometido por *N. caninum* é o bovino. Dentre todos os microrganismos que infectam os bovinos o *N. caninum* é o mais eficientemente transmitido via transplacentária. A proporção de vacas infectadas que transmitem a infecção para seus descendentes é alta, alcançando a

prevalência de 95% de bezerros soropositivos nascidos de mães soropositivas (DUBEY *et al.*, 2007).

Embora o mecanismo preciso da transmissão transplacentária e perda fetal seja pouco compreendido, sabe-se que os taquizoítas são transmitidos da mãe infectada aos fetos pela placenta, podendo causar a infecção fetal e abortamento. Existem essencialmente dois diferentes cenários para a transmissão transplacentária de *N. caninum*: transmissão exógena, que ocorre após a infecção primária da fêmea, durante a gestação (ex: infecção derivada de oocisto) e transmissão endógena da fêmea que adquiriu a infecção antes da prenhez (e possivelmente uma fêmea com infecção crônica persistente que sofreu recrudescência). A recrudescência (ie: reativação da doença) em vacas, seguida de transmissão transplacentária é uma ocorrência comum importante para a persistente difusão do *N. caninum* de uma geração a outra no rebanho. Pouco se conhece sobre as razões da recrudescência da infecção e a frequência que ela pode ocorrer em vacas vazias (DUBEY *et al.*, 2007; GOODSWEN *et al.*, 2013).

Bezerras de vacas infectadas, embora nasçam clinicamente normais, têm 80-90% de chance de serem carreadores de *Neospora*. Quando adultas estas têm uma alta probabilidade de infectar seus próprios bezerros. Desta forma, as vacas permanecem infectadas por toda a vida e podem infectar sua progênie em subsequentes ou alternadas gestações, embora a taxa de infecção possa diminuir com o desenvolvimento da imunidade (DUBEY *et al.*, 2007; GOODSWEN *et al.*, 2013).

Não existem evidências que os oocistos sejam eliminados pelas fezes de vacas adultas assintomáticas e desta forma nenhuma transmissão vaca a vaca foi observada. Apenas demonstrou-se a infecção natural em bovinos, após o nascimento, pela ingestão de oocistos esporulados do ambiente. Não há comprovação de transmissão natural pelas vias lactogênica ou venérea (GOODSWEN *et al.*, 2013). Sugere-se que bezerros podem ser infectados por taquizoítas através do leite, pois a detecção de DNA de *N. caninum* já foi comprovada em amostras de leite e colostro, porém, não há evidências conclusivas da transmissão lactogênica na natureza, pois os autores enfatizam que encontrar DNA não é sinônimo de encontrar *N. caninum* viável (DUBEY *et al.*, 2007).

Sinais clínicos da neosporose em bovinos

Na maioria dos casos, bovinos adultos *Neospora*-infectados não possuem sinais clínicos da doença, sendo apenas relatada perda de peso em bovinos de corte (BARLING *et al.*, 2000) e a maioria das vacas infectadas tem gestação normal. Entretanto, estas são mais susceptíveis a abortamento que vacas sadias, especialmente se elas são infectadas no primeiro terço da gestação. A encefalite não supurativa é considerada sinal patognomônico nos fetos abortados devido à neosporose (GOODSWEN *et al.*, 2013). O nascimento de bezerros fracos tem sido relatado. Eles nascem com pouco peso, tendem a ser incapazes de levantar, podendo ter defeitos neurológicos e cegueira (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; GOODSWEN *et al.*, 2013).

Diagnóstico de *N. caninum*

Embora aos exames sorológicos não confirmem a infecção, eles demonstram o nível de exposição do rebanho ao agente pesquisado. A sorologia pode ser também informativa e investigações após relatos de abortamento geralmente comparam a titulação em grupos de vacas com e sem abortamento de um mesmo rebanho (GOODSWEN *et al.*, 2013). Diferentes métodos sorológicos podem ser utilizados, sendo o ELISA (ensaio imunoenzimático) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) os mais comuns. A imunofluorescência indireta tendo sido considerada como técnica de referência (“*gold standard*”) em neosporose (FRÖSSLING *et al.*, 2003).

O diagnóstico de *Neospora* associado ao abortamento é geralmente realizado pela detecção de encefalite não supurativa no feto abortado (GOODSWEN *et al.*, 2013). O isolamento de *N. caninum* viável, a imunohistoquímica, bem como a pesquisa de DNA, principalmente em amostras de cérebro, são ferramentas específicas de diagnóstico (DUBEY *et al.*, 2007).

O isolamento de *N. caninum* viável pode ser feito por meio das técnicas de cultivo celular (*in vitro*) ou de bioensaio em camundongo, gerbil ou cão imunossuprimidos (*in vivo*), a partir de amostras de cérebro e medula espinhal dos animais infectados, principalmente de fetos abortados (DUBEY *et al.*, 2007).

Métodos baseados em PCR têm sido utilizados e desenvolvidos nos últimos anos, visando à região ITS1 do DNA ribossomal do *N. caninum* (GONDIM *et al.*, 2004A) e a sequências específicas do DNA na região Nc5 (YAMAGE *et al.*, 1996). Na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR realizam-se diferentes modificações no tipo de *primer* (MULLER *et al.*, 1996) e/ou no número de *primers* e reações, como ocorre na *nested* ou *semi-nested* PCR (ELLIS *et al.*, 1999).

Distribuição de *N. caninum*

A soroprevalência de anticorpos anti- *N. caninum* (RIFI, títulos entre 1:25 a 1:250) foi de 11,2 a 91,2%, em bovinos leiteiros nos Estados de Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Para bovinos de corte, foi de 6,7 a 62,5%, nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia e São Paulo (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 2007; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008; DUBEY e SCHARES, 2011; CARVALHO-PATRÍCIO *et al.*, 2013).

A soroprevalência para *N. caninum* no Paraná foi de 46,9% (83/177) em vacas leiteiras (MEIRELLES *et al.*, 2014). A soroprevalência por Mesorregiões do Paraná variou de 35 a 38% na região Centro-Oriental (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008), de 12 a 15% na região Norte Central (GUIMARAES *et al.*, 2004; OGAWA *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2011); de 24 a 30% na região Sudoeste (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008; CAMILLO *et al.*, 2010; LANGONI *et al.*, 2013); foi de 33% no Oeste; 20% no Sudeste; 26% na Metropolitana de Curitiba e 28% no Noroeste (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008).

No Brasil, relatou-se o isolamento de *N. caninum* em bezerros, ovelhas, búfalos e cães (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004; DUBEY *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2007; DUBEY e SCHARES, 2011). A detecção de DNA, sem o isolamento, ocorreu em cabras, capivaras, galinhas e pardais (TRUPPEL *et al.*, 2010; DUBEY e SCHARES, 2011).

***N. caninum* em touros e suas implicações na transmissão do parasita**

O primeiro estudo sorológico de *N. caninum* em touros (*Bos taurus*) destinados a reprodução foi realizado na Espanha. Verificou-se soroprevalência de 11,2% (32/285) por RIFI. A idade dos animais e a raça não foram fatores significativos, sugerindo que a infecção pós-natal seja baixa e que não há preferência de parasitismo entre as onze raças estudadas (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004A).

No Brasil, Pituco *et al.* (2005) verificaram que a soroprevalência da neosporose em touros de centrais de inseminação artificial (CIA) por ELISA variou de 20,0% (26/130) a 25,4% (30/118).

O primeiro relato de detecção de DNA de *N. caninum* (*nested PCR*) em sêmen de touros naturalmente infectados ocorreu em oito animais da raça Holandesa, de um a seis anos, residentes em uma CIA na Espanha, sendo cinco soropositivos e três soronegativos (grupo controle) por RIFI com título igual ou superior a 1:250 em dois testes. Detectou-se DNA de *Neospora* no sêmen fresco com eliminação intermitente em quatro dos cinco animais soropositivos, durante dez coletas semanais, num total de 76 amostras. Os estudos com 80 amostras de sêmen congelado destes mesmos animais demonstraram DNA em apenas três amostras de sêmen de touros diferentes. Os resultados obtidos mostraram que todos os touros soropositivos eliminaram, esporadicamente, DNA de *Neospora* em sêmen fresco não diluído e sêmen congelado diluído. A frequência de DNA em todas as amostras foi de 7,1% (11/156), sendo obtida apenas da fração celular do sêmen e não do plasma seminal. A concentração variou de 1 a 2,8 parasitas/mL de sêmen fresco, sendo a maior concentração 7,5. Nas amostras positivas de sêmen congelado, o número de parasitas ficou abaixo do nível de detecção da técnica de PCR em tempo real (<0,1 taquizoítas por reação) (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003).

Levantamento comparativo em amostras de sangue e sêmen de touros naturalmente infectados por *N. caninum* foi realizado na Espanha durante 22 semanas. Apenas seis dos oito touros soropositivos (RIFI, título 1:250) apresentaram DNA de *Neospora* (*nested-PCR*) em amostras de sangue (7,9%) e/ou sêmen (9,8%) durante o período estudado. A detecção do parasito foi intermitente sendo que apenas em um animal detectou-se DNA

simultaneamente no sangue e no sêmen. Outros três animais apresentaram DNA em sangue e sêmen, porém, em datas diferentes. Os demais também apresentaram DNA de *Neospora*, sendo que um apenas no sêmen e o outro apenas no sangue. Dessa maneira, os autores não encontraram associação entre a presença de DNA de *N. caninum* no sêmen e no sangue. Embora em nem todos os animais soropositivos tenha sido detectado DNA de *N. caninum*, 65% (5/8) apresentaram presença intermitente de *N. caninum* no sêmen, sendo que a contagem de parasitas variou de 1 a 10/mL de sêmen, com média de 2,5. O máximo de parasitas por ejaculado equivaleu a 100 (FERRE *et al.*, 2005).

No mesmo estudo os autores não obtiveram sucesso no isolamento de *N. caninum* viável a partir de amostras de sêmen fresco de touro positivas na *nested*-PCR, por meio do bioensaio com camundongos (*BALB/c nu/nu*). Eles atribuem o insucesso da técnica a diversas causas, tais como os efeitos tóxicos do sêmen bovino que não permitiram que fosse inoculada mais que 400 µL de sêmen fresco nos camundongos. Com base na carga parasitária detectada nas amostras positivas, o número de parasitas em 400 µL de sêmen fresco bovino foi de aproximadamente quatro taquizoítas. Além disso, as amostras foram inoculadas 48h após a coleta, devido à espera dos resultados da PCR, o que pode ter comprometido a viabilidade do parasita nesse período (FERRE *et al.*, 2005).

A detecção ocasional de DNA de *N. caninum* foi relatada em sêmen congelado de touros naturalmente infectados na Espanha por Caetano-da-Silva *et al.* (2004b). Os autores coletaram amostras de sêmen de 20 touros soropositivos na RIFI a 1:250, sendo detectado DNA (*nested* PCR) em pelo menos uma amostra de oito animais (40%). Entretanto, apenas 14 do total de 180 amostras de sêmen congelado analisadas no estudo foram positivas para o DNA de *N. caninum* (7,8%), sendo que novamente apenas na fração celular do sêmen este foi detectado, sugerindo que o protozoário pode estar associado a algum tipo celular. Caetano-da-Silva *et al.* (2004b) sugerem que provavelmente as células de defesa como as fagocíticas mononucleares ou as polimorfonucleares sejam as responsáveis pelo transporte do parasita no sangue, uma vez que os anticorpos circulantes e o complemento provavelmente eliminariam os taquizoítas extracelulares durante a reativação. O tráfego de leucócitos na disseminação de parasitas intracelulares via um mecanismo do tipo

“Trojan horse” tem sido postulada para outros parasitas apicomplexas tais como o *Toxoplasma gondii* (BARRAGAN e SIBLEY, 2003).

Caetano-da-Silva *et al.* (2004b) também analisaram no mesmo estudo alíquotas adicionais de sêmen de três touros DNA *Neospora*-positivos, das mesmas partidas de sêmen num total de 27 e apenas uma amostra foi positiva, demonstrando a baixíssima prevalência do protozoário no sêmen congelado. Ao PCR quantitativo, todas as amostras foram negativas, demonstrando que a concentração de protozoário está abaixo da sensibilidade desta técnica.

No Brasil, Pituco *et al.* (2005) relataram que o uso do PCR para detecção de DNA de *N. caninum* em 1.124 partidas de sêmen fresco de touros soropositivos para *N. caninum* (prevalência de 20 a 25,4%) residentes em CIA não detectou amostras positivas. Entretanto, quando utilizada a semi-nested PCR (limiar de detecção de 10 taquizoítas/mL) em 55 amostras da mesma origem, apenas uma foi positiva. Na Suíça, Staubli *et al.* (2006) observaram que todas as amostras de sêmen de 20 touros soropositivos para *N. caninum* usados para inseminação artificial (cinco partidas de cada animal) foram negativas por nested-PCR.

Na Espanha, detectou-se a presença de DNA de *N. caninum* por meio da nested-PCR em sangue e sêmen de seis touros, da raça *Asturiana de los Valles*, experimentalmente infectados, pela via endovenosa, com 10^8 taquizoítas vivos da cepa NC-1, sendo três animais reinfectedos dez meses após a primeira exposição. O estudo demonstrou que a presença intermitente e o baixo número de parasitas no sêmen de animais reinfectedos foi muito similar ao encontrado em animais primariamente infectados. Comparando-se os dados de detecção de DNA de *N. caninum* em sêmen de touros experimentalmente infectados com aqueles naturalmente infectados, 100% dos primeiros apresentaram DNA em algum momento durante o período estudado (FERRE *et al.*, 2008), contra 62,5% dos animais naturalmente infectados (FERRE *et al.*, 2005). Além disso, a quantidade de parasito foi o dobro em touros experimentalmente infectados (seis taquizoítas/mL de sêmen) que nos naturalmente infectados (três taquizoítas/mL de sêmen). O máximo de taquizoítas encontrado em sêmen de touros reinfectedos experimentalmente foi de 15,6/mL, sugerindo que seja encontrado aproximadamente 200 taquizoítas por ejaculado (FERRE *et al.*, 2008).

Por outro lado, a transmissão venérea do *N. caninum* pode ser possível, mas ainda é considerada improvável. Inseminação de vacas com sêmen congelado, experimentalmente inoculado com 1×10^7 taquizoítas de *N. caninum* não foi capaz de causar infecção. Apenas uma das quatro vacas apresentou sorologia positiva, pelo teste de aglutinação direta no dia dez, com titulação 1:80, considerada baixa pelos autores, e logo se tornou soronegativa no dia 45 (título 1:20) (CANADA *et al.*, 2006).

No caso de novilhas, a inseminação com sêmen fresco artificialmente contaminado por 1×10^7 taquizoítas de *N. caninum* foi capaz de causar a infecção destas. As nove novilhas reagiram com soroconversão e resposta específica ao IFN γ . A detecção de DNA de *N. caninum* em sangue, cérebro, fígado, pulmão e útero das novilhas confirmaram a infecção. A taxa de concepção foi de apenas uma nas nove novilhas do grupo tratamento, sendo muito baixa se comparada com o grupo controle seis em nove (66,6%), o que indica maior número de perdas embrionárias no grupo inseminado com sêmen infectado. Não se encontrou DNA de *N. caninum* nos embriões (SERRANO *et al.*, 2006).

Apenas 15 de 24 novilhas (62,6%) inseminadas com sêmen inoculado com dose igual ou maior que 5×10^3 taquizoítas de *N. caninum* demonstraram resposta imune humoral mensurável, sendo que treze reagiram com soroconversão persistente quando utilizado sêmen contendo 5×10^4 e 5×10^5 taquizoítas de *N. caninum*, indicando exposição contínua aos antígenos do parasita. Isto mostra que a transmissão via intrauterina pode sofrer um efeito do número de taquizoítas viáveis. No mesmo estudo, apenas uma vaca soroconverteu persistentemente, com dose (5×10^5) superior a que causou soroconversão em novilhas (SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007).

Até o presente, não há relatos de isolamento do *N. caninum* em sêmen de touros. Sendo assim, faz-se necessário investigar a viabilidade de *N. caninum* em amostras de sêmen de touros naturalmente infectados para elucidar a participação dos machos na disseminação e persistência do parasita nos rebanhos.

Referências bibliográficas

BARLING, K. S. *et al.* Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **J Am Vet Med Assoc**, v. 217, n. 9, p. 1356-60, Nov 1 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1356>>. Acesso em: 05/05/2013.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 9, p. 426-30, Sep 2003. Disponível em: < [http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(03\)00205-1.pdf](http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(03)00205-1.pdf)>. Acesso em: 05/05/2013.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd**, v. 70, n. 2, p. 271-4, 1984.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 19-24, Sep 20 2004a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350658> >. Acesso em: 05/05/2013.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1329-36, Oct 1 2004b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325558> >. Acesso em: 05/05/13.

CAMILLO, G. *et al.* Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000600033&nrm=iso >. Acesso em: 15/02/15.

CANADA, N. *et al.* Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 139, n. 1-3, p. 109-14, Jun 30 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542775> >. Acesso em: 05/05/13.

CARVALHO-PATRICIO, M. A. *et al.* *Neospora*-DNA prevalence in rabies-negative cattle with neurological disorders. **Vet Rec**, v. 172, n. 9, p. 238, Mar 2 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322543> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, May 1 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391851> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P. *et al.* Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). **Vet Parasitol**, v. 201, n. 1-2, p. 150-3, Mar 17 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.032>>. Acesso em: 10/02/015.

DUBEY, J. P. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 382-387, 9/27/2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711003566> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, Aug 4 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704458> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-67, Apr 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428888> >. Acesso em: 05/05/13.

ELLIS, J. T. *et al.* Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1589-96, Oct 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608446> >. Acesso em: 10/02/15.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-18, Mar 15 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725454> >. Acesso em: 05/05/13.

FERRE, I. *et al.* Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 905-11, Apr 15 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336895> >. Acesso em: 05/05/13.

FRÖSSLING, J. *et al.* Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 3, p. 141-153, 3/20/2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587702002167> >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 6, p. 247-52, Jun 2006. Disponível em: < [http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922\(06\)00081-X.pdf](http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922(06)00081-X.pdf) >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J Parasitol**, v. 90, n. 1, p. 119-22, Feb 2004a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040677> >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 159-61, Feb 2004b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037103> >. Acesso em: 10/02/15.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, v. 13, n. 0, p. 133-50, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985682> >. Acesso em: 05/05/13.

GUIMARAES, J. S., Jr. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, Sep 20 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350656> >. Acesso em: 25/01/15.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 945-50, Jul 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149793> >. Acesso em: 24/08/14.

LANGONI, H. *et al.* Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas. **Vet. Zootec.**, v. 20, p. 124-130, 2013. Disponível em: < <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/646/439> >. Acesso em: 10/02/15.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17 Suppl 1, p. 191-6, Sep 2008. Disponível em: < <http://www.cbpv.org.br/rbpv/documentos/17supl.12008/Protozool001.pdf> >. Acesso em: 25/01/15.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Vet Rec**, v. 153, n. 12, p. 366-7, Sep 20 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533770> >. Acesso em: 05/05/13.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J Parasitol**, v. 87, n. 6, p. 1493-4, Dec 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780849> >. Acesso em: 10/05/14.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004. Disponível em: < http://cbpv.com.br/rbpv/documentos/1332004/c133103_109.pdf >. Acesso em: 05/05/13.

MARQUES, F. A. *et al.* *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitol Res**, v. 108, n. 4, p. 1015-9, Apr 2011. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-010-2146-x> >. Acesso em: 10/05/14

MARSH, A. E. *et al.* Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 209, n. 11, p. 1907-13, Dec 1 1996. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/14262088_Neosporosis_as_a_cause_of_equine_protozoal_myeloencephalitis>. Acesso em: 10/02/15.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001202204&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

MINEO, T. W. *et al.* Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Vet Parasitol**, v. 182, n. 2-4, p. 352-5, Dec 15 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171100375X>>. Acesso em: 210/02/15.

MULLER, N. *et al.* Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 11, p. 2850-2, Nov 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897199> >. Acesso em: 24/08/14.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312-316, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000300006&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

ORTEGA-MORA, L. M. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 301-308, Nov 28 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637032> >. Acesso em: 05/05/13.

PENA, H. F. *et al.* Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 61-6, Jun 20 2007.

PITUCO, E. M. *et al.* Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. 15 a 16 setembro 2005. p.39-41.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 729-37, Mar 1 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126895> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Vet Parasitol**, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, Feb 18 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288958> >. Acesso em: 05/05/13.

STAUBLI, D. *et al.* Search for *Neospora caninum* DNA in bull semen using PCR. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 148, n. 9, p. 483-9, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024977> >. Acesso em: 24/08/14.

TRUPPEL, J. H. *et al.* Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitol Int**, v. 59, n. 3, p. 376-9, Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470895> >. Acesso em: 24/08/14.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **J Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 272-9, Apr 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604096> >. Acesso em: 24/08/14.

CAPÍTULO II: TOXOPLASMOSE EM BOVINOS

Resumo

A toxoplasmose é uma zoonose causada por protozoário *Toxoplasma gondii*. Acomete seres humanos e animais. Foi relatada pela primeira vez em um roedor, o *Ctenodactylus gundi* (Nicolle e Mancaeux em 1908 e 1909), e em um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) no Brasil, por Splendore (1908). O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma*. Os felídeos são os hospedeiros definitivos e uma ampla variedade de espécies de mamíferos e aves são hospedeiros intermediários. A transmissão horizontal ocorre quando o gato ingere cistos teciduais, e após a replicação sexuada, elimina oocistos nas fezes. O hospedeiro intermediário ingere os oocistos esporulados com água e alimento contaminado. A transmissão vertical ocorre quando os taquizoítas replicam-se nos hospedeiros e podem ser transmitidos da mãe para o feto via transplacentária. A maioria dos seres humanos infectados são assintomáticos, mas o parasita pode produzir uma doença grave. Os bovinos são mais resistentes à toxoplasmose clínica que outras espécies pecuárias, mas em ovelhas e cabras pode causar morte embrionária e reabsorção, morte fetal e mumificação, aborto, natimorto e morte neonatal. O diagnóstico pode ser sorológico (RIFI e ELISA), biológico (isolamento em cultivo celular ou em camundongos), histológico, imunohistoquímica e por PCR. As amostras podem ser secreções, excreções, fluidos corporais, tecidos de biópsia e tecidos com lesões macroscópicas após a morte. A alta prevalência de *T. gondii* em bovinos no Brasil é intrigante porque este tem sido raramente isolado de carne em todo o mundo. O primeiro isolamento de *T. gondii* viável a partir de amostras de sêmen de animais naturalmente infectados foi realizado em cães por cultivo celular. O DNA de *T. gondii* foi identificado em carneiros naturalmente infectados em amostras de sêmen, testículos e epidídimos também no Brasil. Em machos experimentalmente infectados por *T. gondii* foi possível detectar DNA do protozoário no sêmen de: coelhos, suínos, ovinos, cães, ratos, bovinos e caprinos. A transmissão venérea do *T. gondii* foi comprovada em estudos experimentais em coelhos, ovelhas e cabras. Até o presente, não há estudos sobre o isolamento ou a detecção de DNA de *T. gondii* em sêmen de touros naturalmente infectados e nem sobre a possível transmissão venérea do parasita em bovinos. Sendo assim, faz-se necessário investigar a viabilidade de *T. gondii* em amostras de sêmen de touros naturalmente infectados para elucidar a participação dos machos na transmissão e persistência do parasita no rebanho.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, sêmen, venérea.

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. It affects humans and animals. It was first reported in a rodent *Ctenodactylus gundi* (Nicolle and Mancaeux, 1908 and 1909) and in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Brazil by Splendore (1908). The *T. gondii* is an obligate intracellular parasite belonging to the Protista kingdom, Apicomplexa phylum, Coccidia class, Eucoccidiida order, Eimeriina suborder, Sarcocystidae family and Toxoplasma genus. Felines are the definitive hosts and a wide variety of species of mammals and birds are intermediate hosts. Horizontal transmission occurs when cats ingest tissue cysts, and after the sexual replication, oocysts are eliminated in the feces. The intermediate host ingests the sporulated oocysts with water and food contaminated. Vertical transmission occurs when tachyzoites replicates in the host and can be transmitted from mother to fetus via placenta. Most infected people are asymptomatic, but parasite can produce a devastating disease. Cattle are more resistant to clinical toxoplasmosis than other livestock species, but in sheep and goats occurs embryonic death and resorption, fetal death and mummification, abortions, stillbirths and neonatal death. Diagnosis can be serological (ELISA and IFA), biological (isolation in cell culture or in mice), histological, immunohistochemical and by PCR. Samples may be secretions, excretions, body fluids, tissue biopsy and tissues with macroscopical lesions after death. The high prevalence of *T. gondii* in cattle in Brazil is intriguing because it has rarely been isolated from meat worldwide. The first isolation of viable *T. gondii* from naturally infected animal semen samples was performed in dogs by the cell culture method. The DNA of *T. gondii* was identified in naturally infected sheep in semen samples, testis and epididymis also in Brazil. In males experimentally infected with *T. gondii* was possible to detect DNA of the parasite in semen rabbits, pigs, sheep, dogs, rats, cattle and goats. The venereal transmission of *T. gondii* was confirmed in experimental studies in rabbits, sheep and goats. Until now, there are no studies on *T. gondii* isolation or DNA detection in semen of naturally infected bulls nor on the possible venereal transmission of the parasite in cattle. Therefore, it is necessary to investigate the viability of *T. gondii* in naturally infected bulls semen samples to elucidate the involvement of males in the transmission and persistence of the parasite in the herd.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, semen, venereal

Introdução

A toxoplasmose é uma doença causada por *Toxoplasma gondii* que acomete seres humanos e animais. Foi relatada pela primeira vez em 1908 em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) na Tunísia por Nicolle e Manceaux (1908); (1909) e em um coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) no Brasil por Splendore (1908) (apud WEISS e DUBEY, 2009).

A toxoplasmose é uma zoonose e o homem é um dos hospedeiros intermediários. A infecção por *Toxoplasma gondii* é largamente disseminada em seres humanos, embora a sua prevalência varie de lugar para lugar (HILL e DUBEY, 2002). Em bovinos no Brasil a soroprevalência variou de 3% a 71% (DUBEY *et al.*, 2012; MEIRELLES *et al.*, 2014).

Classificação do parasito

O *T. gondii* é um protozoário, parasita intracelular obrigatório que pertence ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Coccidia, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma* (GOODSWEN *et al.*, 2013).

Ciclo e hospedeiros

Os felídeos são os hospedeiros definitivos e uma ampla variedade de espécies de mamíferos (suínos, ovinos, caprinos, bovinos, roedores, primatas) e aves (pombos, galinhas) são hospedeiros intermediários (PENA *et al.*, 2006; DUBEY *et al.*, 2008; DUBEY *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2013; VITALIANO *et al.*, 2014). Existem três estágios de infecção para todos os hospedeiros: taquizoítas (individuais ou em grupo), bradizoítas (nos cistos teciduais) e esporozoítas (nos oocistos). O taquizoíta é frequentemente em forma de meia lua crescente e seu tamanho é de 2 µm x 6 µm. Ele entra nas células do hospedeiro por penetração ativa da membrana celular e torna-se envolto pelo vacúolo parasitóforo que protege ele dos mecanismos de defesa do hospedeiro. O taquizoíta multiplica-

se assexuadamente por sucessivas divisões binárias até o rompimento da célula do hospedeiro. Após um número desconhecido de divisões, o taquizoíta de *T. gondii* desenvolve-se em outro estágio chamado de cisto tecidual (DUBEY e LINDSAY, 2006).

Os cistos teciduais crescem e permanecem intracelulares. O seu tamanho varia de 5 a 70 μm e contem de poucos a centenas de bradizoítas. Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em órgãos viscerais, como pulmões, fígado e rins, eles são mais prevalentes nos tecidos musculares e neurais, incluindo cérebro, olhos, músculo cardíaco e esquelético. O cisto tecidual intacto é provavelmente inofensivo e pode persistir por toda a vida do hospedeiro. A parede do cisto tecidual é elástica e fina ($< 0,5 \mu\text{m}$) e pode conter centenas de bradizoítas em forma de meia lua crescente, medindo cada 7 μm x 1,5 μm (DUBEY e LINDSAY, 2006).

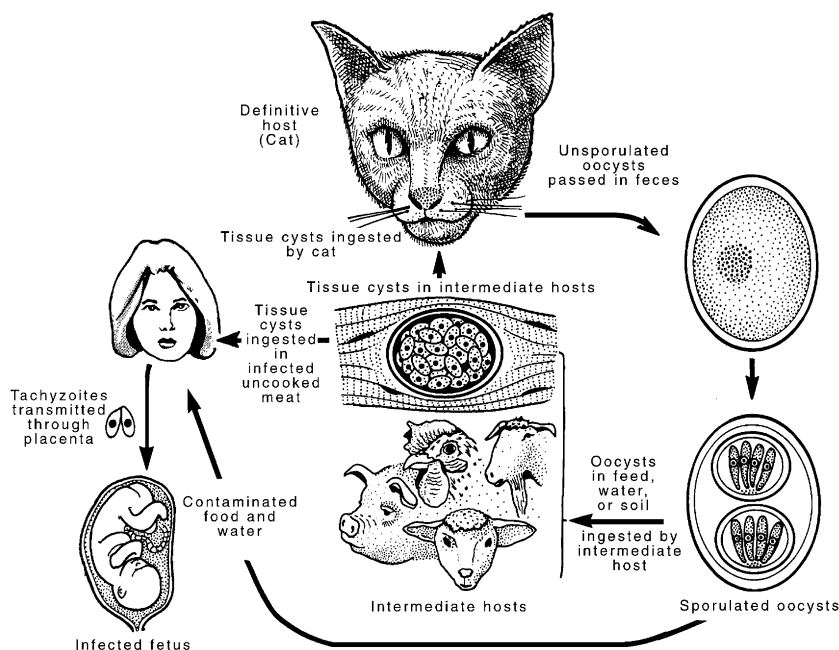


Figura 1: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Transmissão horizontal: o gato se infecta por cistos teciduais e nele ocorre a replicação sexuada, com eliminação de oocistos pelas fezes. O hospedeiro intermediário ingere os oocistos esporulados com água e alimento contaminados. Transmissão vertical: os taquizoítas replicam-se no hospedeiro intermediário e podem ser transmitidos da mãe para feto via transplacentária. **Fonte:** Dubey e Lindsay (2006).

Os bradizoítas diferem pouco dos taquizoítas por terem o núcleo situado para a extremidade posterior enquanto que o taquizoíta é mais central. Além disso, bradizoítas são mais delgados do que taquizoítas e menos suscetíveis à destruição por enzimas proteolíticas. Na ingestão de carne contaminada por

gatos, a parede dos cistos teciduais é digerida por enzimas proteolíticas do estômago e intestino delgado e os bradizoítas são liberados. Alguns penetram na lâmina própria do intestino e se multiplicam como taquizoítas. Em poucas horas o *T. gondii* pode disseminar-se para tecidos não intestinais. Outros bradizoítas penetram nas células epiteliais do intestino delgado e iniciam o desenvolvimento de várias gerações de equizontes assexuados. Os merozoítos são liberados na forma de esquizontes masculinos e gametas femininos. Após o gameta feminino ser fecundado pelo gameta masculino, inicia-se a formação da parede do oocisto ao redor do gameta fecundado. Quando os oocistos estão maduros eles são eliminados no lume intestinal pela ruptura das células epiteliais intestinais. A persistência de *T. gondii* no intestino e nos tecidos extra intestinais do gato ocorre por pelo menos vários meses e possivelmente por toda a vida do gato (DUBEY e LINDSAY, 2006).

O oocisto de *T. gondii* é formado apenas nos gatos, incluindo felídeos selvagens e domésticos. O gato defeca oocistos após a ingestão de taquizoítas, bradizoítas ou esporozoítas. Menos de 50% dos gatos eliminam oocistos nas fezes após a ingestão de taquizoítas ou oocistos, e quase todos eliminam oocisto nas fezes após ingestão de cistos teciduais. Oocistos recém-eliminados nas fezes não são esporulados (não infectantes) e têm formato subesféricos a esféricos, com 10 µm x 12 µm de diâmetro. A esporulação ocorre no ambiente entre um a cinco dias dependendo da oxigenação e temperatura. Oocistos esporulados contém dois esporocistos em forma de elipse. Cada esporocisto contém quatro esporozoítas. Os esporozoítas tem 2 µm x 6 a 8 µm de tamanho (DUBEY e LINDSAY, 2006).

Os hospedeiros intermediários, incluindo os felídeos, podem adquirir o *T. gondii* pela ingestão de tecidos de animais infectados ou de comida ou água contaminada com oocistos esporulados ou pela transmissão transplacentária. Após a ingestão os bradizoítas dos cistos teciduais ou os esporozoítas dos oocistos penetram nos tecidos intestinais, transformam-se em taquizoítas, multiplicam-se no local e são disseminados pelo corpo via sangue ou linfa. Após poucos ciclos de multiplicação, os taquizoítas originam bradizoítas em vários tecidos. A infecção por *T. gondii* durante a gestação pode promover a infecção do feto. A toxoplasmose congênita em seres humanos, ovelhas e cabras é grave, podendo ocorrer a morte fetal (DUBEY e LINDSAY, 2006).

Vias de transmissão de *T. gondii*

A contaminação do ambiente ocorre por oocistos que estão nas fezes de gatos domésticos e outros membros da família *Felidae*. Os gatos domésticos são provavelmente a principal fonte de contaminação através da formação de oocistos após a ingestão de apenas um bradizoíta ou um cisto tecidual, e muitos cistos teciduais podem estar presentes em um rato infectado (HILL e DUBEY, 2002).

Oocistos esporulados sobrevivem no ambiente por longos períodos sob moderadas condições ambientais, podendo sobreviver em solo úmido por meses a anos. Estes podem ser mecanicamente espalhados por moscas, baratas, besouros do esterco e minhocas. Os oocistos sobrevivem nas frutas e vegetais por longos períodos. Embora apenas poucos gatos possam estar eliminando oocistos de *T. gondii* nas fezes a qualquer tempo, o grande número produzido e a sua resistência a destruição garantem a sua disseminação (DUBEY e LINDSAY, 2006).

A infecção em seres humanos é, provavelmente, devido à ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida, pois o *T. gondii* é comum em muitos animais usados para alimentação, incluindo ovelhas, porcos e coelhos (DUBEY e LINDSAY, 2006). Também ocorre pela ingestão de água contaminada com oocistos de fezes de gatos infectados. A infecção pode ser adquirida congenitamente ou pós-natal. A infecção congênita ocorre apenas quando a mulher se infecta durante a gestação (HILL e DUBEY, 2002).

Embora a prevalência de *T. gondii* nos porcos criados sob boas práticas de manejo tenha diminuído drasticamente, as taxas de infecção podem ser altas em porcos criados livres e em condições não higiênicas. Os cistos teciduais podem sobreviver nos animais de pecuária por anos. Todas as porções da carcaça podem conter cistos. Além da infecção pela ingestão de oocistos e de carne crua, a toxoplasmose pode ser transmitida por sêmen, transfusão e ingestão de leite ou saliva e pela ingestão de ovos (DUBEY e LINDSAY, 2006). O papel de bovinos e búfalos na transmissão do *T. gondii* é incerto porque parasitas viáveis raramente têm sido demonstrados na carne (SANTOS *et al.*, 2010).

Sinais clínicos da toxoplasmose

A maioria dos seres humanos infectados são assintomáticos, mas as vezes o parasita pode produzir uma doença devastadora. A infecção congênita adquirida durante o primeiro trimestre da gestação é mais severa que aquela adquirida no segundo e terceiro trimestre. Enquanto a mãe raramente apresenta sintomas de infecção, ela possui uma parasitemia temporária. Lesões focais da placenta e no feto podem tornar-se infectadas. Primeiramente a infecção é generalizada no feto, passando a infectar as vísceras e depois o sistema nervoso central. A tríade dos sinais no feto é: retinocoroidite, hidrocefalia, convulsão e calcificação intracerebral. A infecção pós-natal pode ser localizada ou generalizada. A toxoplasmose está no topo do ranking de doenças que matam pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HILL e DUBEY, 2002).

Orquite por toxoplasma em seres humanos com AIDS tem sido relatada e os principais achados são abundante necrose focal do parênquima testicular e degeneração dos túbulos seminíferos. Os autores relataram que foram encontrados parasitos nos túbulos seminíferos, no citoplasma das células de Sertoli e nadando livre no lume dos túbulos, bem como dentro dos macrófagos do interstício testicular. O espessamento da membrana basal tubular também foi relatado. A frequência da toxoplasmose no comprometimento testicular foi de 60% em todos os casos de autópsia com sinais clínicos, mas em outra série com casos associados a AIDS a incidência foi de 6,25 a 11%. *T. gondii* não foi relatado na epididimite. Nos casos de AIDS com envolvimento prostático por *T. gondii* o parasita foi demonstrado no tecido prostático sem necrose ou resposta inflamatória (MARTINEZ-GARCIA *et al.*, 1996).

T. gondii é capaz de causar doença grave também em animais. Em ovelhas e cabras pode causar morte embrionária e reabsorção, morte fetal e mumificação, aborto, natimorto e morte neonatal. A doença é mais grave em cabras que em ovelhas. Surto de toxoplasmose em porcos têm sido reportados em diversos países em especial no Japão e a mortalidade é mais frequente em porcos jovens que em adultos. Pneumonia, miocardite, encefalite e necrose da placenta ocorrem em porcos infectados. Em gatos e cães a doença é mais grave em animais jovens (DUBEY e LINDSAY, 2006).

Bovinos e equinos são mais resistentes à toxoplasmose clínica que outras espécies pecuárias. Não há casos confirmados de toxoplasmose clínica em bovinos, cavalos e búfalos (DUBEY e LINDSAY, 2006). Os bovinos têm uma alta resistência natural ao parasita (COSTA *et al.*, 2011)

Diagnóstico de *T. gondii*

O diagnóstico pode ser sorológico (RIFI e ELISA), biológico (isolamento em cultivo celular ou em camundongos), histológico, imunohistoquímica e por PCR. As amostras podem ser secreções, excreções, fluidos corporais, tecidos de biópsia e tecidos com lesões macroscópicas após a morte (DUBEY e LINDSAY, 2006).

A imunofluorescência indireta é empregada no diagnóstico sorológico da infecção e em estudos epidemiológicos. Para determinar a soroconversão, indicativo de infecção recente, é importante o emprego de amostras coletadas com intervalos de duas semanas (HILL e DUBEY, 2002). Bois e búfalos são naturalmente resistentes à infecção por *T. gondii* e há evidências que algumas vacas se tornem soronegativas após infecção aparentemente bem sucedida (SANTOS *et al.*, 2009).

O isolamento de *T. gondii* viável pode ser feito por meio das técnicas de cultivo celular (*in vitro*) ou de bioensaio em camundongo e gatos (*in vivo*), a partir de amostras de fluidos corporais, cérebro e tecidos de animais infectados (HILL e DUBEY, 2002; DUBEY *et al.*, 2004).

Métodos baseados em PCR têm sido utilizados e desenvolvidos nos últimos anos para a detecção do DNA de *T. gondii*. A pesquisa pode visar à região ITS1 do DNA ribossomal do *T. gondii* (GONDIM *et al.*, 2004), a sequência específica do DNA na região B1 (PUJOL-RIQUE *et al.*, 1999) ou região não-codificante de 529 pares de base (pb) repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* (HOMAN *et al.*, 2000). Na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR realizam-se diferentes modificações, como *nested* ou *semi-nested* PCR (HURTADO *et al.*, 2001).

Distribuição de *T. gondii*

A infecção por *Toxoplasma gondii* é largamente disseminada em seres humanos, embora a sua prevalência varie de lugar para lugar. Nos EUA e Reino Unido está estimado em 16 a 40% da população infectada, enquanto que na América do Sul e Central e na Europa Continental, estima-se que a infecção varie de 50 a 80% (HILL e DUBEY, 2002). No Brasil, a toxoplasmose é altamente prevalente em seres humanos – até 50% das crianças do ensino fundamental e entre 50 a 80% das mulheres em idade fértil têm anticorpos para *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2012).

Em bovinos a soroprevalência por RIFI (títulos entre 1:16 a 1:64) variou de 3% a 71% (DUBEY *et al.*, 2012; MEIRELLES *et al.*, 2014). A soroprevalência para *T. gondii* em bovinos machos é significativamente maior que em fêmeas (ELFAHAL *et al.*, 2013; FAJARDO *et al.*, 2013), mas não existem trabalhos de soroprevalência em touros destinados a reprodução, seja em centrais de inseminação artificial ou em rebanhos comerciais, até o presente.

A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos variou de 3 a 71% por RIFI (título de 1:16 a 1:64) nos Estados de Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (DUBEY *et al.*, 2012). A soroprevalência para *T. gondii* no Paraná foi de 20,9% (37/177) em vacas leiteiras (MEIRELLES *et al.*, 2014). Na Mesorregião Norte Central deste Estado a soroprevalência foi de 26% (OGAWA *et al.*, 2005) e 31% na Mesorregião Centro-Sul (MOURA *et al.*, 2010).

A alta prevalência de *T. gondii* em bovinos no Brasil é intrigante porque *T. gondii* viável tem sido raramente isolado de carne em todo o mundo, inclusive no Brasil. Não foi possível isolar *T. gondii* a partir de 98 amostras de carne de bovinos em São Paulo-SP e de 98 amostras de diafragmas bovinos em Belo Horizonte-MG. Recentemente, foi isolado *T. gondii* em três fetos (do cérebro e retina) de 50 vacas em um abatedouro de Jaboticabal-SP (DUBEY *et al.*, 2012).

Entretanto, o *T. gondii* viável foi isolado de cérebros de porcos, ovelhas, cabras, capivaras, coelhos, porcos da índia, gatos, cães, ratos, galinhas, no Brasil. Também foi isolado a partir de amostras de coração, pulmão, músculo esquelético, baço e língua de algumas dessas espécies. Os Estados com isolados de *T. gondii* nessas espécies são Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de

Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Ceará, mostrando a ampla distribuição do parasita no país (PENA *et al.*, 2006; PENA *et al.*, 2007; DUBEY *et al.*, 2008; YAI *et al.*, 2009; DUBEY *et al.*, 2012). Em bovinos, o primeiro isolado de *T. gondii* foi de amostras de sangue de vacas leiteiras gestantes e sangue e órgãos (cérebro, coração e pulmão) de seus fetos obtidos em um abatedouro de Santa Catarina (DE MACEDO *et al.*, 2012).

Deteção de *T. gondii* em sêmen e suas implicações na transmissão do parasita

O primeiro isolamento de *T. gondii* viável a partir de amostras de sêmen de animais naturalmente infectados foi recentemente realizado em cães por cultivo celular e confirmada por PCR, no Paraná (KOCH, 2014). O DNA de *T. gondii* foi identificado em amostras de sêmen de carneiros naturalmente infectados (MORAES *et al.*, 2010), testículos e epidídimos (BEZERRA *et al.*, 2013), também no Brasil.

Estudos experimentais para a detecção de *T. gondii* em sêmen vem sendo realizado em várias espécies. Em machos experimentalmente infectados por *T. gondii* foi possível detectar DNA do protozoário no sêmen de: coelhos (LIU *et al.*, 2006B), suínos (MOURA *et al.*, 2007), ovinos (LOPES *et al.*, 2009), cães (ARANTES *et al.*, 2009), ratos (TERPSIDIS *et al.*, 2009), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009) e caprinos (SANTANA *et al.*, 2010).

A transmissão venérea do *T. gondii* foi comprovada em estudos experimentais em coelhos (LIU *et al.*, 2006A), ovelhas (DE MORAES *et al.*, 2010) e cabras (WANDERLEY *et al.*, 2013), mas o mesmo não foi obtido por Blewett *et al.* (1982) em ovelhas.

A infecção experimental de carneiros com *T. gondii* foi capaz de provocar eliminação do parasito no sêmen, evidenciado tanto por isolamento em bioensaio em camundongos quanto por PCR. O uso dos reprodutores experimentalmente infectados na cobertura de ovelhas soronegativas causou a soroconversão destas em aproximadamente cinco a dez dias após a cobertura. Além disso, isolou-se *T. gondii* dos cordeiros nascidos destas fêmeas (LOPES *et al.*, 2013).

Até o presente, não há estudos sobre o isolamento ou a detecção de DNA de *T. gondii* em sêmen de touros naturalmente infectados e nem sobre a possível transmissão venérea do parasita em bovinos. Sendo assim, foi feita a investigação quanto a viabilidade de *T. gondii* em amostras de sêmen de touros naturalmente infectados para elucidar a participação dos machos na transmissão e persistência do parasita no rebanho.

Referências bibliográficas

ARANTES, T. P. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Exp Parasitol**, v. 123, n. 2, p. 190-4, Oct 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622353> >. Acesso em: 13/04/14.

BEZERRA, M. J. G. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 989-991, 2013. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000800007&nrm=iso >. Acesso em: 13/04/14.

BLEWETT, D. A. *et al.* Toxoplasmosis in rams: possible significance of venereal transmission. **Vet Rec**, v. 111, n. 4, p. 73-5, Jul 24 1982.

COSTA, G. H. *et al.* *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 277-81, Jan 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736009> >. Acesso em: 24/09/14.

DE MACEDO, M. F. *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 1, p. 74-7, Jan-Mar 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534951> >. Acesso em: 25/08/14.

DE MORAES, É. P. B. X. *et al.* Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 318-322, 6/24/ 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710000981> >. Acesso em: 20/05/14.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776427> >. Acesso em: 25/01/15.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 22, n. 3, p. 645-71, Nov 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071358> >. Acesso em: 25/01/14.

DUBEY, J. P. *et al.* *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **J Parasitol**, v. 90, n. 4, p. 721-6, Aug 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359466> >. Acesso em: 24/08/14.

DUBEY, J. P. *et al.* Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, Nov 7 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804329> >. Acesso em: 24/08/14.

ELFAHAL, A. M. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. **ISRN Vet Sci**, v. 2013, p. 895165, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171116> >. Acesso em: 25/01/15.

FAJARDO, H. V. *et al.* Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 191, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800302> >. Acesso em: 25/01/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J Parasitol**, v. 90, n. 1, p. 119-22, Feb 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040677> >. Acesso em: 10/02/15.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, v. 13, n. 0, p. 133-50, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985682> >. Acesso em: 05/05/13.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 10, p. 634-40, Oct 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390281> >. Acesso em: 10/02/15.

HOMAN, W. L. *et al.* Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 1, p. 69-75, Jan 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675747> >. Acesso em: 10/02/15.

HURTADO, A. *et al.* Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 17-27, 12/3/ 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170100526X> >. Acesso em: 10/02/15.

KOCH, M. d. O. **Isolamento in vitro de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados**. 2014. 94pp Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1884/36301>>. Acesso em: 10/02/15.

LIU, S. G. *et al.* Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, n. 3, p. 166-70, Jun 2006a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094613> >. Acesso em: 24/08/14.

LIU, S. G. *et al.* Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with *Toxoplasma* tachyzoites. **Chin Med J (Engl)**, v. 119, n. 8, p. 701-4, Apr 20 2006b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635418> >. Acesso em: 24/08/14.

LOPES, W. D. *et al.* Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected rams (*ovis aries*). **J Parasitol Res**, v. 2009, n. Article ID 602803, p. 6, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721328> >. Acesso em: 24/08/14.

LOPES, W. D. *et al.* Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Vet Parasitol**, Jan 9 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.056> >. Acesso em: 05/05/13.

MARTINEZ-GARCIA, F. *et al.* Protozoan infections in the male genital tract. **J Urol**, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 340-9, Aug 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683676> >. Acesso em: 24/08/14.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001202204&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

MORAES, É. P. B. X. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001100003&script=sci_arttext >. Acesso em: 05/05/13.

MOURA, A. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 430-434, Oct 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007001000008 >. Acesso em: 05/05/13.

MOURA, A. B. *et al.* Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil. **Archives of Veterinary**

Science, v. 15, n. 2, p. 94-99, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v15i2.14779> >. Acesso em: 24/08/14.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C R Seances Acad Sci.**, v. 147, p. 763–766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C R Seances Acad Sci.**, v. 148, p. 369–372, 1909.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312-316, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000300006&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

PENA, H. F. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 1, p. 58-67, Aug 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289158> >. Acesso em: 24/08/14.

PENA, H. F. *et al.* Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 61-6, Jun 20 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451882> >. Acesso em: 24/08/14.

PUJOL-RIQUE, M. *et al.* Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 857-62, Sep 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482297> >. Acesso em: 24/08/14.

SANTANA, L. F. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 3, p. 179-82, Jul-Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943023> >. Acesso em: 05/05/13.

SANTOS, S. L. *et al.* Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia sp.*, and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitol Res**, v. 106, n. 2, p. 457-61, Jan 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943064> >. Acesso em: 24/08/14.

SANTOS, T. R. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 161, n. 3-4, p. 324-6, May 12 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232473> >. Acesso em: 25/01/15.

SCARPELLI, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 1, p. 59-64,

2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000100009 >. Acesso em: 10/05/14.

SIQUEIRA, D. B. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild marsupials and rodents from the Atlantic forest of Pernambuco state, northeastern region, Brazil. **J Parasitol**, v. 99, n. 6, p. 1140-3, Dec 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829204> >. Acesso em: 24/08/14.

SPLENDORÉ, A. Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo**, v. 3, p. 109–112, 1908.

TERPSIDIS, K. I. *et al.* *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 3, p. 238-41, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19063884> >. Acesso em: 05/05/13.

VITALIANO, S. N. *et al.* Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. **J Zoo Wildl Med**, v. 45, n. 1, p. 197-9, Mar 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712186> >. Acesso em: 24/02/15.

WANDERLEY, F. S. *et al.* Experimental vaginal infection of goats with semen contaminated with the "CPG" strain of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 99, n. 4, p. 610-3, Aug 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391103> >. Acesso em: 24/08/14.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895-901, 02/13 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704023/> >. Acesso em: 10/02/15.

YAI, L. E. *et al.* Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 162, n. 3-4, p. 332-7, Jun 10 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375864> >. Acesso em: 24/08/14.

**CAPÍTULO III: SOROPREVALÊNCIA DE NEOSPOROSE E
TOXOPLASMOSE EM TOUROS DESTINADOS A MONTA
NATURAL NO PARANÁ E SANTA CATARINA, BRASIL E
ASSOCIAÇÃO COM POSSÍVEIS FATORES DE RISCO**

Resumo

A neosporose e a toxoplasmose são doenças que causam aborto e seus agentes etiológicos são os protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, respectivamente. Possuem impacto econômico na bovinocultura e a toxoplasmose é uma zoonose. O objetivo do trabalho foi estabelecer a soroprevalência para *N. caninum* e *T. gondii* em touros e correlacionar com dados do rebanho. Foram avaliados 108 touros de 14 propriedades localizadas nas mesorregiões Centro-Oriental (seis) e Metropolitana de Curitiba (seis), no Paraná, e mesorregião Serrana de Santa Catarina (duas). Os touros eram de diferentes raças e idades, criados para a reprodução em monta natural. O sangue foi coletado em tubos sem anticoagulante. No soro foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI, título de 1:50). Comparou-se a soroprevalência e os dados do rebanho: idade, raça, aptidão, ocorrência de aborto, presença de cães livres (*N. caninum*) e presença de gatos livres (*T. gondii*), por teste do Qui-Quadrado ($p=0,05$). A soroprevalência foi de 14,8% (16/108) para *N. caninum* e 38,9% (42/108) para *T. gondii*. Não houve associação de raça, aptidão, idade e presença de hospedeiro definitivo com a soroprevalência para *N. caninum* ou *T. gondii*. Houve associação significativa da ocorrência de aborto em propriedades com touros soropositivos para *N. caninum*. Pode-se concluir que a ocorrência de toxoplasmose em touros é maior que a neosporose nas regiões estudadas. As doenças ocorrem em todas as idades e diferentes raças, independente da aptidão da raça. A ocorrência de neosporose e de toxoplasmose independe da presença do hospedeiro definitivo na propriedade. O aborto é sinal clínico associado com a presença de touros soropositivos para *N. caninum*.

Palavras chave: *N. caninum*, *T. gondii*, RIFI, aborto.

Abstract

The neosporosis and toxoplasmosis are abortive diseases caused by protozoan *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, respectively. Both have an economic impact on cattle but toxoplasmosis is a zoonosis. The aim of this study was to establish the seroprevalence of *N. caninum* and *T. gondii* infection in bulls and correlate with herd data. There were 108 bulls evaluated in 14 properties located in East-Central (six) and Metropolitan of Curitiba (six), Regions of Paraná and Serrana Region of Santa Catarina (two), in Brazil. The bulls were of different races and ages, created for reproduction in natural mating. Blood was collected in tubes without anticoagulant. In serum, the search of anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* antibodies was performed by indirect immunofluorescence assay (IFA, title 1:50). The prevalence was compared with herd data: age, race, ability, abortion occurrence, presence of free dogs (*N. caninum*) and presence of free cats (*T. gondii*), by chi-square ($p = 0.05$). The seroprevalence was 14.8% (16/108) for *N. caninum* and 38.9% (42/108) for *T. gondii*. There was no association of race, ability, age or presence of definitive host with the seroprevalence of *N. caninum* or *T. gondii*. There was a significant association between the occurrence of abortion in properties with seropositive bulls for *N. caninum*. It can be concluded that the occurrence of toxoplasmosis in bulls is greater than neosporosis in regions studied. Diseases occur in all ages among different races, regardless of race ability. The occurrence of neosporosis and toxoplasmosis is independent from the presence of the definitive host in the farm. Abortion is a clinical sign associated with the presence of seropositive bulls for *N. caninum*.

Key-words: *N. caninum*, *T. gondii*, IFA, abortion

Introdução

O *Neospora caninum* é um protozoário que é considerado o principal agente causador de abortamento e natimortos em bovinos no mundo. Estima-se que as perdas econômicas na pecuária fiquem em torno de 2 a 5% ao ano, mas ocasionalmente podem ultrapassar 20% (GOODSWEN *et al.*, 2013). O cão, o coiole, o dingo e o lobo-cinza são os hospedeiros definitivos de *N. caninum*, porém, uma ampla variedade de animais domésticos e silvestres tem sido exposta a este agente (DUBEY e SCHARES, 2011). O *N. caninum* é morfológicamente similar ao *Toxoplasma gondii*, mas estas espécies de protozoários são biologicamente diferentes. A neosporose afeta principalmente bois e cães e não é considerada uma zoonose, enquanto que a toxoplasmose, causada por *T. gondii*, é uma importante doença em seres humanos, ovelhas, gatos e outros animais homeotérmicos. Os felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* e uma ampla variedade de espécies de mamíferos (suínos, ovinos, caprinos, bovinos, roedores, primatas) e aves (pombos, galinhas) são hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 2012). Esses agentes são parasitas intracelulares obrigatórios, coccídios, do filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae e sua distribuição é mundial (DUBEY e LINDSAY, 2006).

Estudada no Brasil por diversos autores (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 2007; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008; DUBEY e SCHARES, 2011; CARVALHO-PATRÍCIO *et al.*, 2013), a neosporose apresenta, segundo estes estudos, soroprevalência de anticorpos anti- *N. caninum* (RIFI, títulos entre 1:25 a 1:250) de 11,2 a 91,2%, em bovinos leiteiros nos Estados de Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Para bovinos de corte, a soroprevalência relatada é de 6,7 a 62,5%, nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia e São Paulo.

O primeiro estudo sorológico de *N. caninum* em touros destinados a reprodução foi realizado na Espanha. Verificou-se soroprevalência de 11,2% (32/285) por RIFI (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004). No Brasil, Pituco *et al.* (2005) verificaram que a soroprevalência da neosporose em touros de Centrais de Inseminação Artificial pelo método ELISA variou de 20,0% (26/130) a 25,4% (30/118).

Diversos estudos têm sido realizados para correlacionar a soropositividade para *N. caninum* com parâmetros reprodutivos em vacas, tais como: taxa de repetição de cio, reabsorção fetal, índice de abortamento, produção de leite (PABON *et al.*, 2007; YANIZ *et al.*, 2010). Poucos trabalhos foram realizados tendo o touro como enfoque principal, mas o DNA de *N. caninum* já foi detectado em sêmen de touros naturalmente infectados na Espanha (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003).

A toxoplasmose é altamente prevalente em seres humanos e animais no Brasil. A prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos variou de 3 a 71% por RIFI (título de 1:16 a 1:64) nos Estados de Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (DUBEY *et al.*, 2012; MEIRELLES *et al.*, 2014).

A soroprevalência para *T. gondii* em bovinos machos é significativamente maior que em fêmeas (ELFAHAL *et al.*, 2013; FAJARDO *et al.*, 2013), mas não existem trabalhos de soroprevalência em touros destinados a reprodução, seja em centrais de inseminação artificial ou em rebanhos comerciais.

Assim, assume-se importante avaliar a soroprevalência destas doenças em touros, uma vez são, potencialmente, disseminadores do agente dentro do rebanho e até mesmo entre rebanhos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi correlacionar a soroprevalência de *N. caninum* e *T. gondii* em touros destinados a monta natural com dados do rebanho para verificar possíveis fatores de risco.

Material e métodos

O presente estudo foi conduzido em 14 propriedades rurais localizadas nas mesorregiões Centro-Oriental (seis) e Metropolitana de Curitiba (seis), do Estado do Paraná, e mesorregião Serrana do Estado de Santa Catarina (duas). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo SCA-UFPR-054/2013).

Animais e Rebanho

As amostras de sangue de 108 touros foram coletadas em tubos sem anticoagulante, por venopunção dos vasos coccígeos. A idade dos animais variou entre nove meses e oito anos e estes eram criados para a reprodução em monta natural. Os touros estudados foram classificados em duas categorias de raças: “Canchim” (68); “outras raças” (40), sendo elas: Angus (14), Holandês (13), Braford (3), Charolês (2), Nelore (2), Caracu (1), Hereford (1), Pinzgauer (1) e Mestiço (3). Os touros também foram classificados por aptidão: carne (94) e leite (14).

Os rebanhos ao qual estes animais pertenciam eram controlados para brucelose, leptospirose, IBR e BVD através de esquemas de vacinação. Os dados do rebanho foram coletados por meio de questionário aos proprietários, sendo eles: idade, raça, aptidão da raça (carne/leite); ocorrência de aborto na propriedade além do esperado (sim/não), presença de gatos livres na propriedade (sim/não), presença de cães livres na propriedade (sim/não).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As amostras de sangue foram centrifugadas, após a coagulação, a 3.745 G por cinco minutos, em centrífuga Sigma® (modelo 3K30) para obtenção do soro. Os soros foram mantidos congelados a -20 °C até as análises. A pesquisa de anticorpos foi realizada por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em lâminas com taquizoítas de *N. caninum* (cepa NC-1) e de *T. gondii* (cepa RH). O soro foi diluído na proporção de 1:50 em solução tampão fosfato (PBS pH 7,2). Como anticorpo secundário, utilizou-se conjugado anti-IgG bovino (Sigma/F-7887) na diluição de 1:100. Os animais soropositivos a 1:50 foram titulados. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta. A presença de fluorescência em todo o taquizoíta foi considerada como resultado positivo. Os soros controle positivo e negativo foram incluídos em todas as análises segundo Locatelli-Dittrich *et al.* (2001).

Análise estatística

Realizou-se análise descritiva com as frequências absoluta e relativa de animais soropositivos e soronegativos para ambos os agentes e para cada dado avaliado. Os dados de rebanho obtidos foram comparados um a um com a

soroprevalência para *N. caninum* e para *T. gondii* pelo teste de Qui-Quadrado no nível de significância de $p=0,05$, para verificar se houve associação entre as informações do rebanho e a ocorrência das doenças.

Resultados

A soroprevalência em 108 touros destinados a monta natural nos dois Estados, foi maior para o *T. gondii* (38,9%; 42/108) que para o *N. caninum* (14,8%; 16/108). Considerando o rebanho positivo aquele com pelo menos um touro soropositivo, a soroprevalência por rebanhos foi de 35,7% (5/14) para *N. caninum* e de 57,1% (8/14) para o *T. gondii*.

A titulação de anticorpos para *N. caninum* e para *T. gondii* aparece na Figura 1. Dos animais soropositivos, as titulações obtidas para *T. gondii* foram maiores que para o *N. caninum*. A titulação dos touros soropositivos foi menor ou igual a 1:100 em 100% (16/16) para o *N. caninum* e de 90,5% (38/42) para o *T. gondii*.

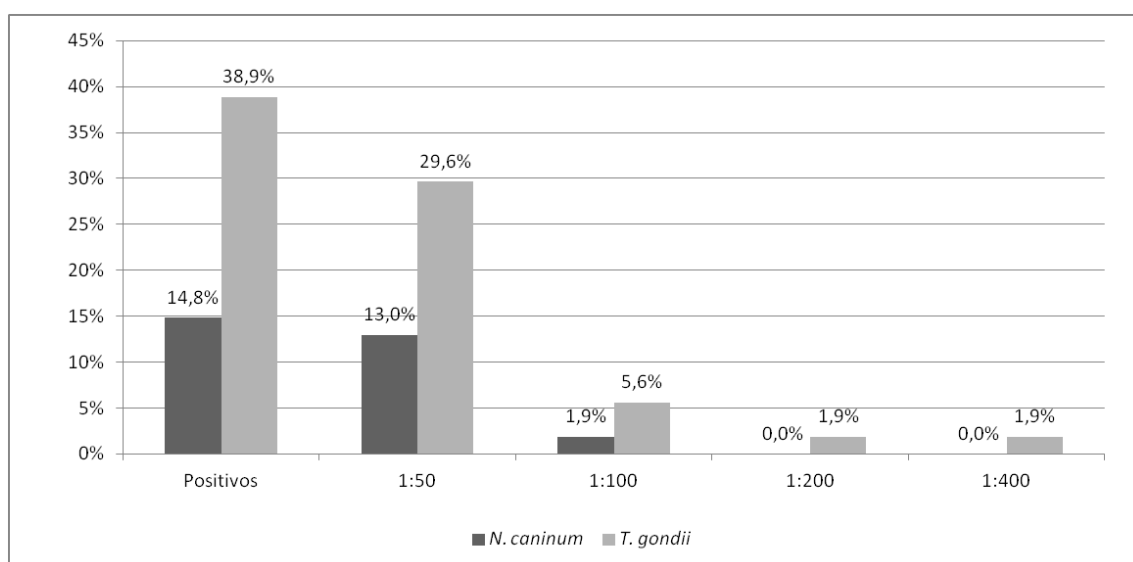


Figura 1: Soroprevalência e titulação de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em touros destinados a monta natural.

Apenas 3,7% (4/108) dos animais apresentaram coinfeção de *N. caninum* e *T. gondii*, sendo soropositivos para ambos. Os animais que

apresentaram coinfeção eram provenientes de três propriedades distintas, porém todas situadas na Região Centro-oriental do Paraná.

Todos os animais soropositivos para *N. caninum* tinham aptidão para carne, sendo: treze da raça Canchim, um Nelore, um Caracu e um Mestiço. Dos touros soropositivos para *T. gondii*, 88,1% eram animais de raças de corte (37/42) e 11,9% de raças de leite (5/42), sendo: Canchim (31/42), Holandês (5/42), Angus (4/42), Braford (1/42) e Caracu (1/42). A Tabela 1 mostra que não houve associação entre as raças, aptidão e a soroprevalência para *N. caninum* ou para *T. gondii*.

Na mesma tabela é apresentada a distribuição da soroprevalência em relação à idade, para os dois protozoários. Não houve associação significativa entre a idade dos touros e a soroprevalência para *N. caninum* ou para *T. gondii*.

TABELA 1: CORRELAÇÃO DA SOROPOSITIVIDADE PARA *N. CANINUM* E *T. GONDII* DE TOUROS DESTINADOS À MONTA NATURAL COM AS CARACTERÍSTICAS DO REBANHO.

FATORES x AGENTES	<i>N. caninum</i>						<i>T. gondii</i>					
	Positivos	Negativos	Total	Percentual Positivos	χ^2	P-valor	Positivos	Negativos	Total	Percentual Positivos	χ^2	P-valor
Raças												
Canchim	13	55	68	19,1%	2,69	0,10	31	37	68	45,6%	3,47	0,06
Outras	3	37	40	7,5%			11	29	40	27,5%		
Aptidão												
Corte	16	78	94	17,0%	2,80	0,09	37	57	94	39,4%	0,07	0,79
Leite	0	14	14	0,0%			5	9	14	35,7%		
Idade (anos)												
<1	0	3	3	0,0%	2,84	0,59	0	3	3	0,0%	8,47	0,08
1-2	10	38	48	20,8%			15	33	48	31,3%		
2-3	4	31	35	11,4%			20	15	35	57,1%		
3-4	1	8	9	11,1%			3	6	9	33,3%		
>4	1	12	13	7,7%			4	9	13	30,8%		
Ocorrência de aborto												
Sim	15	43	58	25,9%	11,85*	0,0006	21	38	59	35,6%	0,41	0,52
Não	1	48	49	2,0%			20	28	48	41,7%		
Presença de hospedeiro definitivo livre												
Sim	15	78	93	16,1%	0,50	0,48	12	33	45	26,7%	0,21	0,65
Não	1	11	12	8,3%			4	8	12	33,3%		

*Associação significativa entre os fatores e a soroprevalência em um grau de significância de $p=0,05$

Observou-se no mínimo um cão livre em 10 das 14 propriedades (71,4%), com média de 2,6 cães por propriedade, variando de 0 a 10 cães. Estes dados foram comparados com a sorologia dos touros para neosporose. Não houve associação entre a presença de cães e a soroprevalência para *N. caninum*.

Observou-se no mínimo um gato livre em 4 de 14 propriedades (28,6%), com média de 0,7 gatos por propriedade, variando de 0 a 2 gatos. Estes dados foram comparados com a sorologia dos touros para toxoplasmose. Não houve associação entre a presença de gatos e a soroprevalência para *T. gondii*.

Houve associação significativa da ocorrência de aborto em propriedades onde os touros eram soropositivos para *N. caninum* (1;n=108)=11,85, $p<0,05$, conforme mostrado na Tabela 1. O mesmo não ocorreu para *T. gondii*.

Discussão

A soroprevalência por rebanhos foi maior para o *T. gondii* (57,1%; 8/14) que para o *N. caninum* (35,7%; 5/14), o que mostra que a distribuição nos touros é mais difusa para o *T. gondii*, nas regiões estudadas. Em nível de indivíduo, a soroprevalência nos touros destinados a monta natural também foi maior para o *T. gondii* (38,9%; 42/108) que para o *N. caninum* (14,8%; 16/108).

Para o *N. caninum*, o resultado do presente estudo foi similar ao de Caetano-da-Silva *et al.* (2004) que obtiveram uma soroprevalência de 11,2% (32/285) em touros destinados a reprodução em monta natural na Espanha. Entretanto, a soroprevalência para neosporose encontrada no presente estudo é menor que a observada em touros de Centrais de Inseminação Artificial no Brasil, que variou de 20,0% (26/130) a 25,4% (30/118) em estudo realizado por Pituco *et al.* (2005).

Até o presente, não foram encontrados estudos sobre a soroprevalência de *T. gondii* em touros, sendo este trabalho, o primeiro a identificar uma alta soroprevalência de toxoplasmose (38,9%; 42/108) em touros destinados a reprodução em monta natural.

A titulação dos touros soropositivos foi menor ou igual a 1:100 em 100% (16/16) para o *N. caninum* e em cerca de 90,5% (38/42) para o *T. gondii*. Outros autores no Brasil encontraram dados semelhantes em bovinos para *T. gondii*, evidenciando infecção crônica, com 98% (988/1008) dos positivos com títulos menores que 1:1024 no Mato Grosso (SANTOS *et al.*, 2009) e 100% (32/32) dos positivos com títulos inferiores a 1:256 em Minas Gerais (FAJARDO *et al.*, 2013).

Apenas 3,7% (4/108) dos animais apresentaram coinfeção de *N. caninum* e *T. gondii*, sendo soropositivos para ambos. Ogawa *et al.* (2005) obtiveram resultado semelhante em um estudo com vacas leiteiras no Norte do Paraná, no qual 12% (45/385) foram soropositivos para *N. caninum* e 26% (102/385) para *T. gondii*, mas apenas quatro animais (1%) apresentaram coinfeção. Na Espanha, Panadero *et al.* (2010) obtiveram soroprevalência de 7,3% (13/178) para *T. gondii* e de 24,1% (43/178) para *N. caninum*, e apenas quatro vacas (2,2%) apresentaram coinfeção. Nas Filipinas, em 96 vacas, a soroprevalência foi de 16,7% e de 5,3% para *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente, sendo que apenas 3,1% apresentaram coinfeção (KONNAI *et al.*, 2008). Xu *et al.* (2012) também verificaram baixa incidência de coinfeção (1,4% - 5/365) em vacas de leite no Sul da China.

Soroprevalência x raça e aptidão da raça

A não associação entre as raças, aptidão e a soroprevalência para *N. caninum* ou para *T. gondii* observado no presente estudo condiz com o achado por outros autores.

Em um estudo no Sudão, a associação entre a raça e a soroprevalência de bovinos para *T. gondii* não foi encontrada (ELFAHAL *et al.*, 2013). Outros trabalhos com bovinos no Brasil também não encontraram associação entre a soroprevalência e a aptidão da raça para *N. caninum* (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2006; OSHIRO *et al.*, 2007). Diferem de Moore *et al.* (2002) que verificaram associação positiva entre a soroprevalência para *N. caninum* em rebanhos leiteiros na Argentina.

Soroprevalência x idade dos touros

A não associação significativa entre a idade dos touros e a soroprevalência para *N. caninum* observada no presente estudo, também foi relatada na Espanha (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004). A associação entre a idade e a soroprevalência para *N. caninum* em vacas também não foi observada por Corbellini *et al.* (2006) e em vacas por Albuquerque *et al.* (2011) no Brasil. Na China, Yu *et al.* (2007) não encontraram associação entre a idade e a soropositividade para *N. caninum* em vacas leiteiras. Corbellini *et al.* (2006)

afirmaram que a não associação entre a soroprevalência para *N. caninum* e a idade dos animais sugere que algum grau de transmissão transplacentária está presente na população estudada. Entretanto Gonzalez-Warleta *et al.* (2008) verificaram maior incidência de neosporose em vacas que em novilhas na Espanha, sendo 1,5 vezes mais alta a soropositividade em animais mais velhos. Em um estudo no Norte do Paraná encontrou-se associação entre a soroprevalência e a idade em vacas de leite, sendo os animais mais velhos com maior soroprevalência, o que sugere a presença de oocistos esporulados no ambiente e assim a contaminação horizontal (GUIMARAES *et al.*, 2004).

Outros autores também não relataram associação significativa entre soroprevalência de *T. gondii* a idade de bovinos (QIU *et al.*, 2012) e a idade de vacas leiteiras (ZHOU *et al.*, 2012) na China. Diferentemente, no Sudão foi observada associação significativa da soropositividade para *T. gondii* em bovinos jovens (< 1 ano), mas os autores sugerem que este dado pode estar associado à presença de anticorpos maternos (ELFAHAL *et al.*, 2013).

Soroprevalência x presença do hospedeiro definitivo

Não houve associação entre a presença do hospedeiro definitivo e a soroprevalência nem para *N. caninum* (cães) ou para *T. gondii* (gatos).

Outros estudos no Brasil também não encontraram associação entre a presença de cães e a soropositividade dos rebanhos para *N. caninum* no Mato Grosso do Sul (OSHIRO *et al.*, 2007) e em Rondônia (AGUIAR *et al.*, 2006). Entretanto, Guimaraes *et al.* (2004) verificaram a associação entre a soroprevalência de *N. caninum* e a presença de cães na propriedade, em um estudo no Norte do Paraná. O mesmo foi encontrado por Otranto *et al.* (2003) na Itália e por Gonzalez-Warleta *et al.* (2008) na Espanha.

Outros autores também não verificaram associação entre a toxoplasmose e a presença de gatos em propriedades no Norte do Paraná (OGAWA *et al.*, 2005), no Centro-oeste do Brasil (SANTOS *et al.*, 2009) e no Sul da Espanha (GARCIA-BOCANEGRA *et al.*, 2013). Diferentemente, no Sudeste do Brasil, Albuquerque *et al.* (2011) identificaram que a presença de gatos e o maior número deles na propriedade aumentou o risco de infecção por toxoplasmose, porém estes autores verificaram que o maior número de gatos na propriedade não foi real risco se eles não estavam em contato com o gado ou com a água.

Soroprevalência x ocorrência de abortamento na propriedade

Houve associação significativa, conforme mostrado na Tabela 1, da ocorrência de aborto em propriedades onde os touros eram soropositivos para *N. caninum*. O mesmo não ocorreu para *T. gondii*.

Não foram encontrados estudos sobre a associação entre a soroprevalência de touros e a ocorrência de abortamento no rebanho, entretanto, Gonzalez-Warleta *et al.* (2008) determinaram que vacas soropositivas para *N. caninum* tem 5,3 vezes mais chances de abortar que vacas soronegativas. Da mesma forma, em estudo no Pantanal, MS, Andreotti *et al.* (2010) verificaram que as chances de perda de gestação foram 15% maiores em vacas de corte soropositivas que em soronegativas. Estes autores também estimaram que o risco de abortamento em vacas soropositivas é de 3 a 7% maior que em vacas soronegativas. Oshiro *et al.* (2007) verificaram que rebanhos soropositivos para *N. caninum* tem 2,52 vezes mais chances de ter aborto que rebanhos soronegativos. Todas estas informações tornam completamente justificável o resultado encontrado no presente estudo, da associação entre abortamento e soroprevalência positiva de touros nas propriedades.

Contrapondo estes achados, outros estudos no Brasil identificaram a presença de *N. caninum* em animais com problemas reprodutivos, mas não verificaram associação significativa entre o agente e as perdas reprodutivas (OGAWA *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2006; MINEO *et al.*, 2006; KONNAI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2012).

Para o *T. gondii*, Albuquerque *et al.* (2011) não encontraram associação entre a ocorrência de aborto e a soroprevalência em vacas. Elfahal *et al.* (2013) não encontraram associação entre a soroprevalência para *T. gondii* e o registro de problemas reprodutivos em vacas tais como: aborto, natimortos ou infertilidade.

Esses dados concordam com os achados de Moore *et al.* (2008) que na pesquisa em 666 abortos espontâneos na Argentina, obtiveram uma prevalência de 9,9% para *N. caninum* como causa do abortamento (pelas técnicas de RIFI, IHQ e PCR), mas nenhum foi positivo para *T. gondii* (*nested-PCR*).

Conclusões

A soroprevalência de *T. gondii* é maior que a de *N. caninum* em touros destinados a monta natural, neste estudo. A ocorrência de coinfeção de *T. gondii* e *N. caninum* é baixa em touros. As doenças ocorrem em todas as idades, não tendo associação com nenhuma faixa etária. Não houve associação das doenças a qualquer raça, independente da aptidão da raça. A ocorrência de neosporose independe da presença de cães livres e a ocorrência de toxoplasmose independe da presença de gatos livres na propriedade.

A toxoplasmose é uma doença endêmica na região estudada, sendo sua soroprevalência em relação aos indivíduos alta e a presença ocorre em mais da metade dos rebanhos estudados. Os títulos de anticorpos acima de 1:100 podem sugerir a presença de alguns touros com infecção aguda ou recrudescente.

A neosporose, apesar de ter uma soroprevalência menor, tanto entre os indivíduos quanto entre os rebanhos também é endêmica na região. Entretanto, a presença do *N. caninum* está associada à ocorrência de abortamento nas propriedades.

Perspectivas

Sugere-se que mais estudos sejam realizados para elucidar a importância dos touros na transmissão e manutenção de *N. caninum* nos rebanhos que utilizam a reprodução através da monta natural e o papel desta relação na incidência de abortos na propriedade.

Referências bibliográficas

AGUIAR, D. M. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Vet Parasitol**, v. 142, n. 1-2, p. 71-7, Nov 30 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857319> >. Acesso em: 25/01/15.

ALBUQUERQUE, G. R. *et al.* Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle, state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 287-290, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000400003&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

ANDREOTTI, R. *et al.* Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 2, p. 119-23, Apr-Jun 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624350> >. Acesso em: 25/01/15.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 19-24, Sep 20 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350658> >. Acesso em: 05/05/13.

CARVALHO-PATRICIO, M. A. *et al.* *Neospora*--DNA prevalence in rabies-negative cattle with neurological disorders. **Vet Rec**, v. 172, n. 9, p. 238, Mar 2 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322543> >. Acesso em: 05/05/13.

CORBELLINI, L. G. *et al.* Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Prev Vet Med**, v. 74, n. 2-3, p. 130-41, May 17 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343669> >. Acesso em: 25/01/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776427> >. Acesso em: 25/01/15.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 22, n. 3, p. 645-71, Nov 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071358> >. Acesso em: 25/01/14.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, Aug 4 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704458> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-67, Apr 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428888> >. Acesso em: 05/05/13.

ELFAHAL, A. M. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. **ISRN Vet Sci**, v. 2013, p. 895165, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171116> >. Acesso em: 25/01/15.

FAJARDO, H. V. *et al.* Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 191, 2013.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800302> >. Acesso em: 25/01/15.

GARCIA-BOCANEGRA, I. *et al.* *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. **J Parasitol**, v. 99, n. 3, p. 438-40, Jun 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145484> >. Acesso em: 25/01/15.

GONZALEZ-WARLETA, M. *et al.* Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Parasitol Res**, v. 102, n. 2, p. 243-9, Jan 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17899194> >. Acesso em: 25/01/15.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, v. 13, n. 0, p. 133-50, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985682> >. Acesso em: 05/05/13.

GUIMARAES, J. S., Jr. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, Sep 20 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350656> >. Acesso em: 25/01/15.

KONNAI, S. *et al.* A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. **Acta Trop**, v. 105, n. 3, p. 269-73, Mar 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243149> >. Acesso em: 25/01/15.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17 Suppl 1, p. 191-6, Sep 2008. Disponível em: < <http://www.cbvpv.org.br/rbpv/documentos/17supl.12008/Protozool001.pdf> >. Acesso em: 25/01/15.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J Parasitol**, v. 87, n. 6, p. 1493-4, Dec 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780849> >. Acesso em: 10/05/14.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001202204&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

MELO, D. P. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 15, n. 3, p. 105-9, Jul-Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978474> >. Acesso em: 25/01/15.

MINEO, T. W. *et al.* Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 15, n. 4, p. 188-92, Oct-Dec 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196123> >. Acesso em: 25/01/15.

MOORE, D. n. P. *et al.* Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Vet Parasitol**, v. 107, n. 4, p. 303-316, Aug 22 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702001292> >. Acesso em: 08/10/14.

MOORE, D. P. *et al.* The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Vet Parasitol**, v. 156, n. 3-4, p. 163-7, Oct 1 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691819> >. Acesso em: 25/01/15.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312-316, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000300006&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

ORTEGA-MORA, L. M. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 301-308, Nov 28 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637032> >. Acesso em: 05/05/13.

OSHIRO, L. M. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 16, n. 3, p. 133-8, Jul-Sep 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078599> >. Acesso em: 25/01/15.

OTRANTO, D. *et al.* Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Vet Parasitol**, v. 118, n. 1-2, p. 7-18, Dec 1 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651870> >. Acesso em: 05/03/15.

PABON, M. *et al.* Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 40-6, Jun 20 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467905> >. Acesso em: 25/01/15.

PANADERO, R. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Res Vet Sci**, v. 88, n. 1, p. 111-5, Feb 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482324> >. Acesso em: 25/01/15.

PITUCO, E. M. *et al.* Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. 15 a 16 setembro 2005. p.39-41.

QIU, J. H. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle and dairy cattle in northeast China. **Foodborne Pathog Dis**, v. 9, n. 7, p. 579-82, Jul 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22545962> >. Acesso em: 25/01/15.

SANTOS, R. R. *et al.* Quantification of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cows in Minas Gerais, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 3, p. 294-7, Jul-Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070443> >. Acesso em: 25/01/15.

SANTOS, T. R. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 161, n. 3-4, p. 324-6, May 12 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232473> >. Acesso em: 25/01/15.

XU, M. J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in dairy cows in subtropical southern China. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1425-8, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22717118> >. Acesso em: 25/01/15.

YANIZ, J. L. *et al.* Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 4, p. 699-705, Aug 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210662> >. Acesso em: 25/01/15.

YU, J. *et al.* Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 1, p. 79-85, Jan 19 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010521> >. Acesso em: 25/01/15.

ZHOU, D. H. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle in southern China. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 48, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401571> >. Acesso em: 25/01/15.

**CAPÍTULO IV: ISOLAMENTO DE *Neospora caninum* E
Toxoplasma gondii DE AMOSTRAS DE SÊMEN DE TOUROS
NATURALMENTE INFECTADOS**

Resumo

A neosporose e a toxoplasmose são doenças que causam abortamento e seus agentes etiológicos são os protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*, respectivamente. Possuem distribuição mundial e causam impacto econômico na bovinocultura sendo a toxoplasmose uma zoonose. O objetivo foi isolar *N. caninum* e *T. gondii* de amostras de sêmen de touros naturalmente infectados destinados à reprodução em monta natural. O sangue de 36 touros de raça de corte de uma propriedade rural do Paraná foi coletado em tubos sem anticoagulante. No soro foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI, título de 1:50). Em um segundo momento, 15 destes touros (oito soropositivos para *N. caninum*, dois soropositivos para *T. gondii*, dois soropositivos para ambos e três soronegativos para ambos) foram submetidos a coletas pareadas de sangue e sêmen (eletro ejaculação). Alíquotas de sêmen foram inoculadas em células Vero para o isolamento. No sêmen foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers*: Np21/Np6 (*N. caninum*); TOX4/TOX5 (*T. gondii*); e ITS2/ITS5 (ambos). Nos isolados, além dos *primers* utilizados no sêmen, em quatro amostras também foram realizadas a PCR da região NC5-plus (*N. caninum*) e *nested*-PCR da região B1 (*T. gondii*). A soroprevalência foi de 33,3% (12/36) para *N. caninum* e 36,1% (13/36) para *T. gondii*. A PCR das amostras de sêmen foi negativa para *N. caninum* e para *T. gondii*. No cultivo celular, quatro amostras apresentaram efeito citopático, taquizoítas e infecção de 90 a 100% da monocamada em 30 a 45 dias. Os quatro isolados foram positivos para *N. caninum* e *T. gondii* nas análises da PCR. Os resultados comprovam que o *T. gondii* e o *N. caninum* são eliminados viáveis no sêmen de touros naturalmente infectados. A coinfeção e eliminação dos dois agentes, simultaneamente, são possíveis. Este é o primeiro isolado de *T. gondii* e *N. caninum* a partir de sêmen de touros naturalmente infectados.

Palavras-chave: cultivo celular, bovino, PCR, RIFI.

Abstract

Neosporosis and toxoplasmosis are abortive diseases caused by protozoan *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, respectively. They have economic impact in cattle and are distributed worldwide. Toxoplasmosis is zoonosis. The aim of the study was to isolate *N. caninum* and *T. gondii* in semen samples of naturally infected bulls used for natural mating. Blood of 36 beef bulls from a farm with endemic abortions in Paraná was collected in tubes without anticoagulant. In serum, antibody anti- *N. caninum* and anti-*T. gondii* was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA, titer 1:50). In step two, researchers collected blood and semen (electroejaculation) paired samples from 15 bulls (eight seropositive for *N. caninum*, two seropositive for *T. gondii*, two seropositive for both and three seronegative for both). Aliquots of semen were also inoculated on Vero cells culture for isolation. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in semen and culture isolates with primers: Np21/Np6 (*N. caninum*); TOX4/TOX5 (*T. gondii*); and ITS2/ITS5 (both). In culture samples, besides previous primers used in semen, in four samples, researchers used a PCR from NC5 region of *N. caninum* DNA and B1 region of *T. gondii* DNA. Seroprevalence was 33.3% (12/36) to *N. caninum* and 36.1% (13/36) to *T. gondii*. Semen samples were negative for *N. caninum* and *T. gondii* at PCR. Four samples in cell culture had cytopathic effect, free tachyzoites and 90 to 100% monolayer infected at 30 to 45 days post inoculated. Four cell culture isolates were positive for *N. caninum* and *T. gondii* in PCR assays. These results show viable eliminated *N. caninum* and *T. gondii* in semen of naturally infected bulls. This is the first isolate of *N. caninum* and *T. gondii* from semen of naturally infected bulls.

Keywords: cell culture, isolation, cattle, PCR, RIFI.

Introdução

A neosporose e a toxoplasmose são doenças que causam abortamento e seus agentes etiológicos são o *Neospora caninum* e o *Toxoplasma gondii*, respectivamente. A neosporose tem importante impacto econômico na bovinocultura e a toxoplasmose é uma zoonose.

Esses agentes são parasitas intracelulares obrigatórios, coccídios, do filo Apicomplexa, Família Sarcocystidae e sua distribuição é mundial. O cão, o coio, o dingo e o lobo cinza são os hospedeiros definitivos do *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 1988; GONDIM *et al.*, 2004B; KING *et al.*, 2010; DUBEY *et al.*, 2011), enquanto que os felídeos, principalmente o gato doméstico, são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* (DUBEY *et al.*, 2012).

O ciclo biológico dos parasitas é semelhante, sendo os oocistos eliminados apenas pelo hospedeiro definitivo, no qual ocorre a multiplicação da forma sexuada. Nos hospedeiros intermediários a multiplicação ocorre de forma assexuada pela replicação de taquizoítas e bradizoítas. O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir cistos teciduais contendo os bradizoítas nos hospedeiros intermediários e também pela ingestão de oocistos. Os hospedeiros intermediários se infectam pela ingestão de oocistos e também pela via transplacentária (DUBEY e LINDSAY, 2006; GOODSWEN *et al.*, 2013). A transmissão venérea vem sendo estudada, para ambos os parasitas (SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007B; DE MORAES *et al.*, 2010).

O diagnóstico da neosporose e da toxoplasmose é baseado na detecção de anticorpos específicos, nos sinais clínicos e histopatológicos (diagnóstico indireto) e/ou por isolamento, imunohistoquímica e PCR (diagnóstico direto).

A neosporose é diagnosticada pela visualização de lesões características no cérebro, coração e fígado de fetos bovinos abortados, combinado com exames de imunohistoquímica (IHQ) de tecidos contendo lesões e sorologia das mães que abortaram (DUBEY e LINDSAY, 2006).

A toxoplasmose pode ser diagnosticada em fetos humanos com retinocoroidite, hidrocefalia, convulsão e calcificação intracerebral (HILL e DUBEY, 2002), também por sinais neurológicos em adultos, como em cães com convulsão, paresia e paralisia (PLUGGE *et al.*, 2011), e por episódios de morte embrionária e reabsorção, morte fetal e mumificação, natimorto e morte neonatal

em ovinos e caprinos, porém em bovinos é assintomática (DUBEY e LINDSAY, 2006).

A imunofluorescência indireta é amplamente empregada no diagnóstico sorológico da infecção e em estudos epidemiológicos de neosporose e toxoplasmose (MOORE *et al.*, 2008). Métodos baseados em PCR são utilizados e desenvolvidos nos últimos anos, visando à região ITS1 do DNA ribossomal dos parasitos (GONDIM *et al.*, 2004A) e a sequências específicas do DNA: região Nc5 para o *Neospora caninum* (YAMAGE *et al.*, 1996) e região B1 para o *T. gondii* (PUJOL-RIQUE *et al.*, 1999). Na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR realizam-se diferentes modificações, como *nested* ou *semi-nested* PCR (ELLIS *et al.*, 1999; HURTADO *et al.*, 2001).

Soroprevalência de neosporose e toxoplasmose no Brasil

A neosporose em bovinos é endêmica no Brasil e a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* em bovinos, por RIFI (títulos entre 1:25 a 1:250) foi mínima de 6,7% e máxima de 91,2% (DUBEY *et al.*, 2007; DUBEY e SCHARES, 2011; CARVALHO-PATRÍCIO *et al.*, 2013).

Estudos em touros são escassos no Brasil. A soroprevalência de *N. caninum* em touros de rebanho comercial destinados a reprodução em monta natural foi de 13,7% (39/285), na Espanha (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004A). No Brasil, a soroprevalência em touros de centrais de inseminação artificial variou de 20,0% (26/130) a 25,4% (30/118) (PITUÇO *et al.*, 2005).

A toxoplasmose é altamente prevalente em seres humanos e animais no Brasil. Em bovinos a soroprevalência por RIFI (títulos entre 1:16 a 1:64) variou de 3% a 71%, (DUBEY *et al.*, 2012; MEIRELLES *et al.*, 2014). A soroprevalência para *T. gondii* em bovinos machos é significativamente maior que em fêmeas (ELFAHAL *et al.*, 2013; FAJARDO *et al.*, 2013), mas não existem trabalhos de soroprevalência em touros destinados a reprodução, seja em centrais de inseminação artificial ou em rebanhos comerciais.

Deteção dos parasitas no sêmen de touros e a transmissão venérea

O DNA de *N. caninum* foi detectado em sêmen fresco (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; FERRE *et al.*, 2005; JOZANI *et al.*, 2012; SHARIFZADEH *et al.*, 2012) e sêmen congelado (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004B;

SHARIFZADEH *et al.*, 2012; DOOSTI *et al.*, 2015) de touros naturalmente infectados, por *nested*-PCR e por PCR convencional, na Espanha e no Irã. Na Suíça, todas as amostras de sêmen de 20 touros soropositivos para *N. caninum* foram negativas na *nested*-PCR (STAUBLI *et al.*, 2006).

No Brasil não foram detectadas amostras positivas na PCR convencional para *N. caninum* em 1.124 partidas de sêmen fresco de touros soropositivos para *N. caninum* (soroprevalência de 20 a 25,4%) residentes em CIA. Entretanto, quando utilizada a semi-*nested* PCR (limiar de detecção de 10 taquizoítas/mL) em 55 amostras da mesma origem, uma foi positiva (PITUCO *et al.*, 2005).

O primeiro isolamento de *N. caninum* a partir de amostras de sêmen foi realizado no Brasil em sêmen de cães naturalmente infectados por meio do cultivo celular e confirmação com a pesquisa de DNA dos isolados (KOCH, 2014).

A transmissão venérea de *N. caninum* foi comprovada por soroconversão de novilhas inseminadas com sêmen fresco infectado por taquizoítas, (SERRANO *et al.*, 2006; SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007B), mas apenas em concentrações elevadas (5×10^4). Não houve soroconversão ou detecção de DNA em embriões ou bezerros nestes estudos, entretanto, a transmissão venérea não ocorreu em vacas inseminadas com sêmen congelado contaminado com $1,63 \times 10^7$ taquizoítas de *N. caninum* (CANADA *et al.*, 2006) e nem em vacas cobertas por touros infectados com 1×10^8 taquizoítas (OSORO *et al.*, 2009).

Em ovinos, a detecção de DNA de *N. caninum* em sêmen de carneiros, experimentalmente infectados com 1×10^7 taquizoítas, foi positiva, com concentração de 1 a 889 taquizoítas/mL de sêmen (SYED-HUSSAIN *et al.*, 2013). Nesse mesmo estudo, a transmissão venérea a borregas por monta natural com os carneiros infectados não foi comprovada. Todavia, a inoculação de 2×10^5 taquizoítas de *N. caninum* em camundongos machos (CB-17 SCID e BALB/c) foi capaz de transmitir a infecção pela cópula a camundongos fêmeas imunossuprimidas (SCID) e seus neonatos (MASUDA *et al.*, 2007).

Em estudos com machos experimentalmente infectados por *T. gondii* foi possível detectar DNA do protozoário no sêmen de: coelhos (LIU *et al.*, 2006B), cachacos (MOURA *et al.*, 2007), carneiros (LOPES *et al.*, 2009), cães (ARANTES *et al.*, 2009), ratos (TERPSIDIS *et al.*, 2009), touros (SCARPELLI *et al.*, 2009) e bodes (SANTANA *et al.*, 2010). A detecção de DNA de *T. gondii* em machos naturalmente infectados foi realizada no sêmen de carneiros (MORAES *et al.*, 2010), nos

testículos e nos epidídimos de carneiros (BEZERRA *et al.*, 2013), e no sêmen de cães (KOCH, 2014). Em homens soropositivos para *T. gondii*, Martinez-Garcia *et al.* (1996) relataram a presença do protozoário no trato genital (túbulos seminíferos, células de Sertoli, lume dos túbulos e próstata) por exame histopatológico. Entretanto, os mesmos autores relatam a presença do parasita no sêmen de três entre 125 homens naturalmente infectados.

Em animais experimentalmente infectados o *T. gondii* foi isolado do sêmen de bodes (DUBEY e SHARMA, 1980; SANTANA *et al.*, 2010), carneiros (TEALE *et al.*, 1982; LOPES *et al.*, 2009), cachacos (MOURA *et al.*, 2007), cães (ARANTES *et al.*, 2009) e touros (SCARPELLI *et al.*, 2009). O primeiro isolado de *T. gondii* em sêmen de animais naturalmente infectados foi realizado no Brasil em sêmen de cães por meio do cultivo celular e confirmação com a detecção de DNA de *T. gondii* nos isolados (KOCH, 2014).

A transmissão venérea do *T. gondii* foi comprovada em estudos experimentais em coelhos (LIU *et al.*, 2006A), ovelhas (DE MORAES *et al.*, 2010), cabras (WANDERLEY *et al.*, 2013), mas o mesmo não foi obtido por Blewett *et al.* (1982) em ovelhas.

No Brasil, estudos de detecção de *N. caninum* e *T. gondii* em sêmen de touros são escassos (PITUCO *et al.*, 2005; SCARPELLI *et al.*, 2009) e não existem trabalhos no Paraná. O objetivo do presente estudo foi isolar *N. caninum* e *T. gondii* viáveis em sêmen fresco de touros naturalmente infectados, destinados à reprodução em monta natural.

Material e métodos

O presente estudo foi conduzido em uma propriedade rural da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, com histórico de abortos endêmicos, e com estudo sorológico prévio (Capítulo III desta dissertação). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Protocolo SCA-UFPR-054/2013).

Animais

Em uma propriedade rural destinada a criação de touros para a reprodução em monta natural, foram coletadas amostras de sangue de 36 touros de raça de corte (Canchim), com idade entre um e cinco anos, para verificar a soroprevalência de neosporose nesta população. Este estudo sorológico foi parte integrante do trabalho apresentado no Capítulo III desta dissertação. Três meses após a triagem (T1) dos 36 touros da propriedade, foram selecionados aleatoriamente 15 animais, sendo dez soropositivos para *N. caninum* e cinco soronegativos, para a coleta pareada de sangue e sêmen (T2). Os touros foram identificados com a letra N, seguida do número (N01 a N15).

Amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante por punção dos vasos coccígeos. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 3.745 G em centrífuga Sigma® (modelo 3K30) por cinco minutos para obtenção do soro. As amostras foram processadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná. As amostras de soro foram mantidas a -20°C até as análises.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A pesquisa de anticorpos foi realizada por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em lâminas com taquizoítas de *N. caninum* (NC-1).

O soro foi diluído na proporção de 1:50 (ponto de corte) em solução tampão fosfato (PBS pH 7,2). As amostras positivas foram tituladas. Como anticorpo secundário, utilizou-se anti-IgG (Sigma) bovino conjugado à fluoresceína (diluição 1:100). Os soros controle positivo e negativo foram incluídos em todas as análises. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (luz UV) com objetiva de 40x (MEIRELLES *et al.*, 2014).

Amostras de sêmen

A coleta do sêmen foi realizada por eletro ejaculação. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis, adicionado penicilina (500 UI/mL de sêmen) no momento da coleta na propriedade, e refrigerados durante o transporte, a fim

de reduzir contaminação por bactérias. Uma alíquota do sêmen íntegro foi congelada à temperatura de -20 °C para a reação em cadeia da polimerase (PCR), e o restante da amostra foi centrifugada a 1.873 G por 15 min, separando-se o sobrenadante (fluido seminal) do sedimento (fração celular). O sedimento do sêmen de 11 animais foi inoculado em frascos com células Vero para o isolamento.

Isolamento em cultivo celular

O isolamento foi realizado em células Vero. As garrafas de células Vero foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementadas com 10% de soro fetal bovino, penicilina G potássica (2 µL/mL), sulfato de estreptomicina (2 µL/mL) e anfotericina B (0,25 µL/mL).

A fração celular do sêmen (100 a 150 µL de amostra por garrafa) foi inoculada em monocamadas de células Vero de 24 horas com 80% de confluência. Após a inoculação, as garrafas foram incubadas na estufa de CO₂ a 5%, na temperatura de 37°C, por 30 minutos. Foram adicionados mais cinco mililitros de meio e incubadas por mais 30 minutos. Após esse tempo, realizou-se a lavagem da monocamada com o meio, por três vezes. O processamento das amostras foi realizado de maneira asséptica em fluxo laminar linear vertical.

Durante 90 dias, a manutenção do cultivo foi realizada por troca do meio de manutenção, três vezes por semana. Neste período, as garrafas foram observadas no microscópio invertido, a fim de verificar os efeitos citopáticos na monocamada e formas taquizoítas do protozoário (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

Na ocorrência de infecção de 90 a 100% da monocamada de células Vero, a suspensão foi transferida para tubos de Falcon estéreis. Os tubos foram centrifugados a 1.100 G por 10 minutos à 6°C. Descartou-se o sobrenadante, e o sedimento foi lavado com 1 mL de solução de NaCl 0,9%. A solução foi centrifugada novamente, a 1.100 G por 10 minutos à 6°C. Após descartar o sobrenadante, a solução PBS foi adicionada, homogeneizando o sedimento, e transferindo para tubos eppendorf estéreis. Os tubos foram centrifugados a 8.100 G, por 10 minutos, a 4°C e posteriormente armazenados em freezer a -20°C até a análise do PCR (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004).

Após a fase do isolamento, devido aos resultados obtidos, optou-se por investigar o Toxoplasma gondii nas amostras coletadas. Dessa forma, realizou-se a sorologia e titulação das 36 amostras de soro dos touros do T1 (data da triagem) e nas 15 amostras de soro dos touros do T2 (data da coleta de sêmen) para T. gondii, por RIFI (cepa RH). A pesquisa de DNA de T. gondii também foi incluída nas 15 amostras de sêmen íntegro e nas 11 amostras do cultivo celular do sêmen de touros, como será descrito a seguir.

Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A pesquisa do DNA de *N. caninum* e de *T. gondii* foi realizada por meio da técnica de PCR nas 15 amostras de sêmen, nas 11 amostras do cultivo celular inoculadas com sêmen de touro e em uma amostra do cultivo de células Vero sem inóculo (controle negativo). Para a extração do DNA, foi utilizado um kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA obtido foi mantido a – 20°C.

A quantificação de DNA foi realizada no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) do Departamento de Bioquímica da UFPR. As concentrações de DNA foram determinadas nas absorbâncias de 260 nm e 280 nm (KOCH, 2014).

As reações da PCR para os *primers* Np21/Np6, TOX4/TOX5 e ITS2/ITS5 foram realizadas em mix de 25 µL contendo: 0,5 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen); 2,5 µL de PCR *buffer*, 2,5 mM de MgCl₂; 1 UI/µL de *platinum Taq polymerase* (Invitrogen). Os *templates* variaram de 0,5 a 10,8 µL e 60 a 500 ng de DNA final, sendo adicionada água ultra pura *mili-Q* em quantidade suficiente para o volume final da reação. A amplificação foi realizada no termociclador Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler®, em protocolo específico para cada par de *primer*, descritos a seguir (KOCH, 2014).

Em cada reação de amplificação foi utilizado como controle positivo, amostra contendo DNA de *N. caninum* (cepa referência NC-1) para os *primers* Np21/Np6, Np21plus/Np6plus e ITS2/ITS5; amostra contendo DNA de *T. gondii* (cepa referência RH) para os *primers* TOX4/TOX5, ITS2/ITS5 e T1/T2:T3/T4; e como controle negativo, amostra sem DNA (água ultrapura).

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese, utilizando fonte Thermo Scientific® a 95 volts, em gel de agarose a 1,4%. Na eletroforese foi utilizado o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen® 250 µg (1,0 µg/µL), um padrão contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, de 100 a 10.000 pares de bases. Os fragmentos de DNA foram corados com 1,5 µL de Safer®. Os géis foram observados no transiluminador de ultravioleta (Loccus biotecnologia® LTB-20X20ST) e foto documentados (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004; KOCH, 2014).

Deteccção DNA de *N. caninum*:

O alvo da PCR foram as sequências Nc5 do genoma do *N. caninum*. Para tal utilizou-se em todas as amostras os *primers* Np21 (5' GGGTGTGCGTCCAATCCTGTAAC 3') e Np6 (5' CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT 3'), para amplificação de um fragmento de 328 pb, segundo Yamage *et al.* (1996). O protocolo de amplificação para os *primers* Np21/Np6 foi de 5 min de incubação inicial a 94°C, seguido de 32 ciclos de 35 seg a 94°C, 30 seg a 54°C, 30 seg a 72°C e 5 min a 72°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras (KOCH, 2014).

Para a deteção de DNA de *N. caninum* utilizou-se em apenas quatro amostras do isolado do sêmen os *primers* Np21plus (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3') e Np6plus (5'-CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3') para obtenção de um fragmento de 337 pb, segundo Muller *et al.* (1996), com adaptações. A reação da PCR foi realizada em mix de 50 µL contendo: 20 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen); 5 µL de PCR *buffer*, 1,5 mM de MgCl₂; 1,25 UI de *Taq* DNA polymerase *Platinum*® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 5 µL de DNA final, sendo adicionada água ultrapura *mili-Q* em quantidade suficiente para o volume final da reação. O protocolo de amplificação para os *primers* Np21plus e Np6plus foi de 5 min de incubação inicial a 95°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 63°C, 3,5 min a 74°C e 10 min a 74°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras.

Deteccção DNA de *T. gondii*:

O alvo da PCR foi a região não-codificante de 529 pb repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii*. Para tal utilizou-se em todas as amostras os *primers* TOX4 (5'-CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG-3') e TOX5 (5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT-3') para amplificação de um fragmento de 529 pb, segundo Homan *et al.* (2000). O protocolo de amplificação para os *primers* TOX4 e TOX5 foi de 5 min de incubação inicial a 94°C, seguido de 32 ciclos de 35 seg a 94°C, 30 seg a 65°C, 10 seg a 72°C e 5 min a 72°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras, adaptado por Koch (2014).

Os diferentes parasitos pertencem à subfamília *Toxoplasmatinae* e possuem sequências de nucleotídeos diferentes na região codificadora do ITS1, de forma que a análise deste locus permite distinguir estes organismos. A região ITS1 foi investigada em todas as amostras com os *primers* ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (WHITE *et al.*, 1990; GONDIM *et al.*, 2004A; PARAMESWARAN *et al.*, 2009; TRUPPEL, 2009; TRUPPEL *et al.*, 2010) e, que é comum a *N. caninum* e *T. gondii*. O protocolo de amplificação para os *primers* ITS2 e ITS5 foi de 5 min de incubação inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de 20 seg a 94°C, 45 seg a 52°C, 45 seg a 72°C e 5 min a 72°C para a extensão final, seguido de manutenção a 4°C até retirada das amostras (KOCH, 2014).

Quatro amostras do isolado do sêmen foram testadas por *nested* PCR (nPCR) para o gene B1 (BURG *et al.*, 1989). Para a primeira amplificação da PCR, foram usados 10 µM dos *primers* externos T1 (5'-AGCGTCTCTCTTCAAGCAGCGTA-3') e T2 (5'-TCCGCAGCGACTTCTATCTCTGT-3'), e foram usados para a nPCR 10 µM dos *primers* internos T3 (5'-TGGGAATGAAAGAGACGCTAAT GTG-3') e T4 (5'-TTAAAGCGTTCGTGGTCAACTATCG-3') (155bp) conforme o protocolo descrito por Yai *et al.* (2003). Na primeira reação, 13,1 µL de água ultrapura foram usados para cada amostra, com 2,5 µL de PCR *buffer* (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0), 4,0 µL de dNTP (1,25 mM), 1,25 mL de cada *primer* (10 µM), 0,75 µL MgCl₂ (50 mM), 0,15 µL de *Taq* DNA polymerase (5 UI/µL) *Platinum®* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 2,0 µL de amostra de DNA extraído. Foram usadas na nPCR as mesmas quantidades da mistura de reação (mix) com a

adição de 1,0 µL do produto amplificado na PCR. A PCR foi realizada com 25 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min, e a nPCR foi realizada com 35 ciclos a 94°C por 45 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min. As reações foram precedidas de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min e uma extensão final a 72°C por 10 min. Todos os produtos foram processados em gel de agarose a 2,0% corado com SYBR Safe® (Molecular Probes, Portland, Oregon, USA) e reveladas sob luz UV (YAI *et al.*, 2003).

Resultados

Neospora caninum

A soroprevalência de *N. caninum* nos touros da propriedade estudada foi de 33,3% (12/36) no T1. Dentre os 15 touros dos quais foram coletados sêmen, a soroprevalência variou de 66,7% no T1 (10/15) para 33,3% no T2 (5/15), sendo que 33,3% (5/15) dos touros foram soropositivos em ambas as coletas, 33,3% (5/15) eram soropositivos no T1 e tornaram-se soronegativos no T2 e 33,3% (5/15) foram soronegativos em ambos os tempos.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos exames sorológicos e a titulação dos touros soropositivos para *N. caninum* nas datas da triagem (T1) e da coleta de sêmen (T2), e os resultados do isolamento e PCR (sêmen e dos isolados obtidos do cultivo celular). Na PCR do sêmen, todas as amostras foram negativas para *N. caninum*.

No isolamento, dos onze inóculos de sêmen de touro, obteve-se nove isolados com diferentes graus de infecção da monocamada, como mostra a Tabela 1.

Dentre os nove isolados de sêmen de touro no cultivo celular, quatro foram positivos para *N. caninum* com os *primers* Np21plus/Np6plus, com produto de 337 pb (Figura 1). Os controles negativos, água e o DNA extraído do cultivo de células Vero, foram negativos para *N. caninum* nas análises de PCR.

TABELA 1: RESULTADOS DOS EXAMES SOROLÓGICOS E TÍTULO DE ANTICORPOS PARA *N. CANINUM*, ISOLAMENTO *IN VITRO* E PESQUISA DE DNA DE *N. CANINUM* NO SÊMEN ÍNTEGRO E NO ISOLADO DE SÊMEN DE TOUROS DESTINADOS À REPRODUÇÃO EM MONTA NATURAL, ORIUNDOS DA MESORREGIÃO CENTRO-ORIENTAL DO PARANÁ.

Touros	RIFI		Isolamento (cultivo celular)	PCR				
	Neospora caninum			SÊMEN		ISOLADO		
	T 1	T 2		Np21/ Np6 ¹	ITS2/ ITS5 ²	Np21/ Np6 ¹	ITS2/ ITS5 ²	Np21plus/ Np6plus ³
N01	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N02	1:50	1:50	Baixo	neg	neg	neg	neg	n/a
N03	1:50	neg	Moderado	neg	neg	neg	neg	n/a
N04	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N05	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n/a
N06	1:50	1:50	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N07	1:50	neg	Alto	neg	neg	neg	neg	337pb ³
N08	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N09	1:50	neg	Alto	neg	neg	neg	neg	337pb
N10	1:50	1:200	Alto	neg	neg	neg	neg	337pb
N11	1:100	1:50	Alto	neg	neg	neg	neg	337pb
N12	1:50	neg	Moderado	neg	neg	neg	neg	n/a
N13	1:100	neg	Baixo	neg	neg	neg	neg	n/a
N14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n/a
N15	1:50	1:50	Baixo	neg	neg	neg	neg	n/a

Obs.: T1 – Primeira coleta de sangue; T2 – Segunda coleta de sangue, pareada com a coleta de sêmen; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; neg – negativo; n/a – amostra não avaliada; 1 – Primer específico para *N. caninum*; 2 – Primer comum a *N. caninum* e *T. gondii*; 3 – Resultado positivo e tamanho do produto da PCR em pares de base (pb). Padrão de infecção no cultivo celular: Alto – infecção de 90 a 100% da monocamada em 30 a 45 dias; Moderado – infecção em torno de 60% da monocamada em 80 a 90 dias; Baixo – com infecção em torno de 20% da monocamada em 90 dias; Negativo – não apresentaram infecção da monocamada.

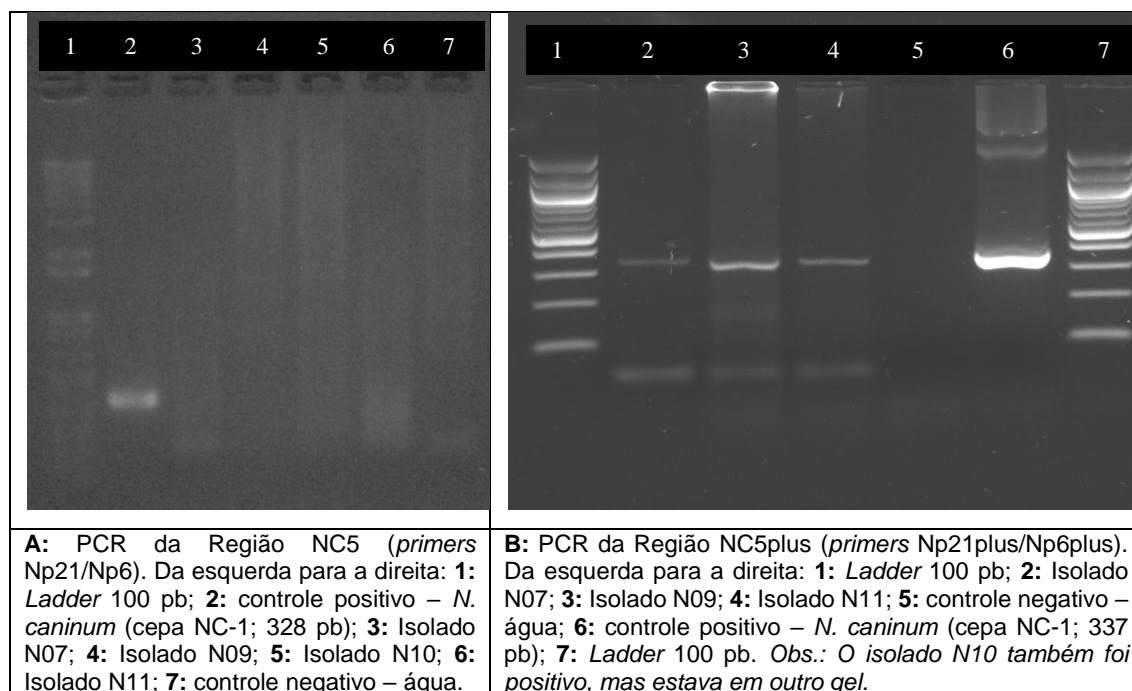


Figura 1: PCR dos isolados obtidos de cultivo celular a partir de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, naturalmente infectados por *N. caninum*.

Considerando-se que apenas quatro dentre nove isolados foram positivos para N. caninum na PCR, investigaram-se anticorpos anti-T. gondii nos soros dos touros e o DNA de T. gondii nas amostras de sêmen e nos isolados. Os resultados estão apresentados a seguir.

Toxoplasma gondii

A soroprevalência para *T. gondii* nos touros da propriedade estudada foi de 36,1% (13/36), no T1. Dentre os 15 touros dos quais foi coletado sêmen, a soroprevalência variou de 26,7% no T1 (4/15) para 60% no T2 (9/15), sendo que 13,3% (2/15) dos touros foram soropositivos em ambas as coletas; 13,3% (2/15) eram soropositivos no T1 e tornaram-se soronegativos no T2; 46,7% (7/15) eram soronegativos no T1 e tornaram-se soropositivos no T2 e 26,7% (4/15) foram soronegativos em ambos os tempos.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos exames sorológicos e a titulação dos soropositivos para *T. gondii* nas datas da triagem (T1) e da coleta de sêmen (T2), e os resultados do isolamento e PCR (sêmen e dos isolados obtidos do cultivo celular). Na PCR do sêmen íntegro, todas as amostras foram negativas para *T. gondii*.

Nos isolados de sêmen de touro no cultivo celular, apenas uma amostra (N11) foi positiva para *T. gondii* nas três técnicas de PCR utilizadas. Uma amostra (N10) foi positiva em duas técnicas (PCR da região ITS1 e nPCR da região B1) e as demais foram positivas em uma das técnicas, sendo a N07 na nPCR da região B1 e a N09 na PCR da região ITS1, conforme mostra a Tabela 2. Na Figura 2 estão representados os produtos da PCR e da *nested*-PCR da região B1 do DNA de *T. gondii* obtidos dos isolados de sêmen de touro. Os controles negativos, água e o DNA extraído do cultivo de células Vero, foram negativos para *T. gondii* nas análises de PCR.

TABELA 2: RESULTADOS DOS EXAMES SOROLÓGICOS E TÍTULO DE ANTICORPOS PARA *T. GONDII*, ISOLAMENTO *IN VITRO* E PESQUISA DE DNA DE *T. GONDII* NO SÊMEN ÍNTEGRO E NO ISOLADO DE SÊMEN DE TOUROS DESTINADOS À REPRODUÇÃO EM MONTA NATURAL, ORIUNDOS DA MESORREGIÃO CENTRO-ORIENTAL DO PARANÁ.

Touros	RIFI <i>Toxoplasma gondii</i>		Isolamento (cultivo celular)	PCR				
	T 1	T 2		SÊMEN		ISOLADO		
				TOX4/ TOX5 ¹	ITS2/ ITS5 ²	TOX4/ TOX5 ¹	ITS2/ ITS5 ²	T1/T2 + T3/T4 ¹
N01	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N02	neg	1:100	Baixo	neg	neg	neg	neg	n/a
N03	neg	1:50	Moderado	neg	neg	neg	neg	n/a
N04	1:50	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N05	1:50	1:100	neg	neg	neg	neg	neg	n/a
N06	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N07	neg	1:50	Alto	neg	neg	neg	neg	155pb ³
N08	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a	n/a	n/a
N09	1:50	1:100	Alto	neg	neg	neg	506pb	neg
N10	neg	1:200	Alto	neg	neg	neg	506pb	155pb
N11	1:50	neg	Alto	neg	neg	529pb	506pb	155pb
N12	neg	1:50	Moderado	neg	neg	neg	neg	n/a
N13	neg	1:100	Baixo	neg	neg	neg	neg	n/a
N14	neg	1:50	neg	neg	neg	neg	neg	n/a
N15	neg	neg	Baixo	neg	neg	neg	neg	n/a

Obs.: T1 – Primeira coleta de sangue; T2 – Segunda coleta de sangue, pareada com a coleta de sêmen; RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; neg – negativo; n/a – amostra não avaliada; 1 – Primer específico para *T. gondii*; 2 – Primer comum a *N. caninum* e *T. gondii*; 3 – Resultado positivo e tamanho do produto da PCR em pares de base (pb).

Padrão de infecção no cultivo celular: Alto – infecção de 90 a 100% da monocamada em 30 a 45 dias; Moderado – infecção em torno de 60% da monocamada em 80 a 90 dias; Baixo – com infecção em torno de 20% da monocamada em 90 dias; Negativo – não apresentaram infecção da monocamada.

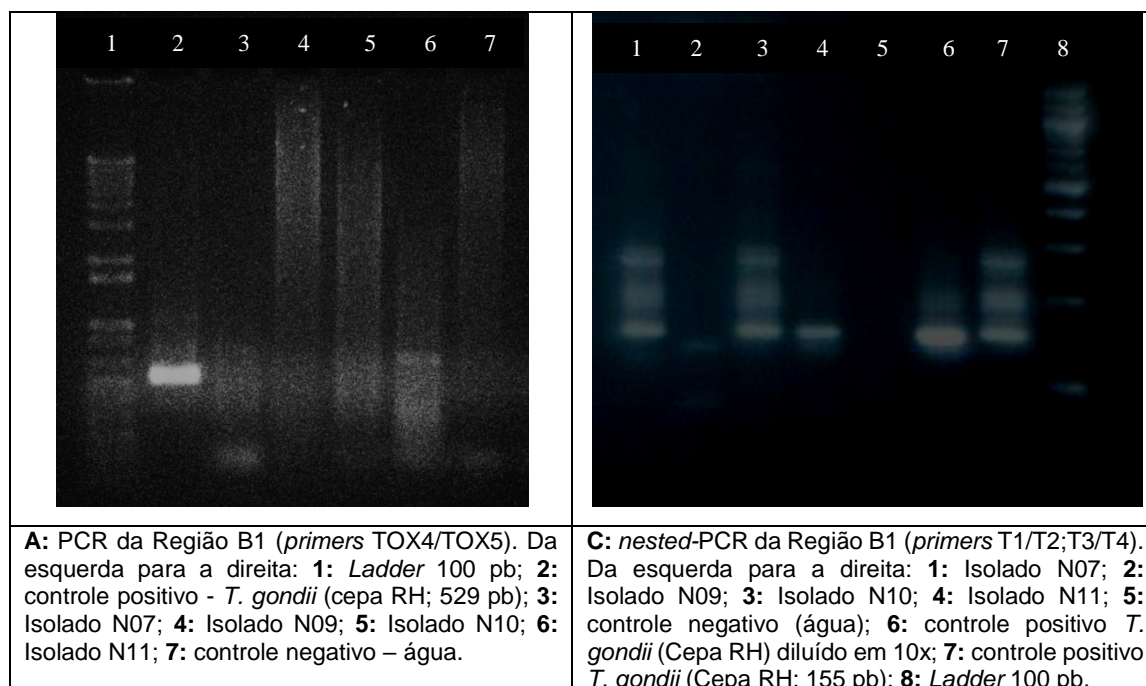


Figura 2: PCR do isolado em cultivo celular a partir de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, naturalmente infectados por *T. gondii*.

Coinfecção de *N. caninum* e *T. gondii*

A coinfecção nos touros do rebanho estudado no momento da triagem (T1) foi de 5,6% (2/36). Porém se for considerado o universo dos 15 touros com coletas de soro no T1 e no T2 e estabelecer-se como coinfecção os resultados dos animais soropositivos em pelo menos um dos tempos, tanto para *N. caninum*, quanto para *T. gondii*, a taxa de coinfecção foi de 53,3% (8/15).

Considerando-se apenas a PCR do cultivo celular, a coinfecção foi comprovada em 36,4% (4/11) dos touros. Na Tabela 3, pode-se observar também que 18,2% (2/11) das amostras que não apresentaram nenhum efeito citopático no cultivo celular eram de touros soropositivos exclusivamente para *T. gondii*. Ainda, dentre as amostras cultivadas, 45,5% (5/11) apresentaram efeitos citopáticos classificados como moderado ou leve, sendo que destes, apenas um touro foi soropositivo apenas para *N. caninum* e os demais apresentaram coinfecção.

TABELA 3: RESULTADO DOS EXAMES SOROLÓGICOS (RIFI), DO ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR DO SÊMEN E DA PCR DO CULTIVO CELULAR DE SÊMEN DE TOUROS DESTINADOS A REPRODUÇÃO EM MONTA NATURAL, ORIUNDOS DA MESORREGIÃO CENTRO-ORIENTAL DO PARANÁ.

Touros	RIFI				Isolamento (cultivo celular)	PCR DO ISOLADO					
	<i>N. caninum</i>		<i>T. gondii</i>			<i>N. caninum</i>			<i>T. gondii</i>		
	T 1	T 2	T 1	T 2		Np21/ Np6 ¹	ITS 2/ ITS5 ²	Np21plus/ Np6plus ¹	TOX4/ TOX5 ³	ITS 2/ ITS5 ²	T1/T2 + T3/T4 ³
N01	neg	neg	neg	neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
N02	1:50	1:50	neg	1:100	Baixo	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a
N03	1:50	neg	neg	1:50	Moderado	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a
N04	neg	neg	1:50	neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
N05	neg	neg	1:50	1:100	neg	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a
N06	1:50	1:50	neg	neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
N07	1:50	neg	neg	1:50	Alto	neg	neg	337pb ⁴	neg	neg	155pb
N08	neg	neg	neg	neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
N09	1:50	neg	1:50	1:100	Alto	neg	neg	337pb	neg	506pb	neg
N10	1:50	1:200	neg	1:200	Alto	neg	neg	337pb	neg	506pb	155pb
N11	1:100	1:50	1:50	neg	Alto	neg	neg	337pb	550pb	506pb	155pb
N12	1:50	neg	neg	1:50	Moderado	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a
N13	1:100	neg	neg	1:100	Baixo	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a
N14	neg	neg	neg	1:50	neg	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a
N15	1:50	1:50	neg	neg	Baixo	neg	neg	n/a	neg	neg	n/a

Obs.: Em destaque (cinza) as análises dos oito animais que apresentaram coinfecção. **T1** – Primeira coleta de sangue; **T2** – Segunda coleta de sangue, pareada com a coleta de sêmen; **RIFI** – Reação de Imunofluorescência Indireta; **PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase; **neg** – negativo; **n/a** – amostra não avaliada; **1** – Primer específico para *N. caninum*; **2** – Primer comum a *N. caninum* e *T. gondii*; **3** – Primer específico para *T. gondii*; **4** – Resultado positivo e tamanho do produto da PCR em pares de base (pb).

Padrão de infecção no cultivo celular: Alto – infecção de 90 a 100% da monocamada em 30 a 45 dias; Moderado – infecção em torno de 60% da monocamada em 80 a 90 dias; Baixo – com infecção em torno de 20% da monocamada em 90 dias; Negativo – não apresentaram infecção da monocamada.

Dentre os animais que apresentaram coinfecção na sorologia, 50% (4/8) eliminaram ambos os protozoários viáveis no sêmen, identificados pelo alto padrão de infecção no cultivo celular e confirmados por PCR, como mostra a Tabela 3.

Padrão de infecção no cultivo celular (in vitro) dos isolados mistos de *N. caninum* e *T. gondii* a partir de sêmen de touros naturalmente infectados

Os efeitos tóxicos do sêmen na monocamada de células Vero após a inoculação podem ser observados na Figura 3-A. O primeiro inóculo realizado foi com 500 µL de sêmen por 1h30min e a monocamada foi completamente destruída devido à toxicidade do sêmen, não sendo possível a manutenção deste cultivo. O segundo inóculo, em frascos novos com monocamada de Vero confluyente, foi bem sucedido. Neste, optou-se por usar 100 - 150 µL de sêmen, com tempo de incubação inicial de 30 min, diluição do inóculo neste momento, incubação por mais 30 min, seguida das lavagens da monocamada. Apesar das modificações no protocolo houve efeitos tóxicos com falhas na monocamada, como mostra a Figura 3-A. Após uma semana, com a multiplicação das células Vero, a monocamada tornou-se completamente confluyente.

As amostras de sêmen submetidas ao cultivo celular foram acompanhadas por 90 dias e, destas, 81,8% (9/11) apresentaram efeito citopático, falhas na monocamada e/ou presença de taquizoítas, sendo que: 36,4% (4/11) apresentaram infecção de 90 a 100% da monocamada em 30 a 45 dias pós inoculação (p.i.) e presença de inúmeros taquizoítas livres, sendo este padrão de infecção classificado como ALTO, como mostra a Figura 3-D; 18,2% (2/11) apresentaram falhas em torno de 60% da monocamada em 80 a 90 dias, com poucos taquizoítas livres, classificado como MODERADO, como mostra a Figura 3-E; 27,3% (3/11) com falhas em torno de 20% da monocamada em 90 dias, classificado como BAIXO; e 18,2% (2/11) não apresentaram infecção da monocamada, classificados como NEGATIVO, como mostra a Figura 3-F.

As quatro amostras que causaram alta infecção celular (N07, N09, N10, N11), as quais também foram positivas nas análises da PCR tanto para *N. caninum* quanto para *T. gondii*, apresentaram um padrão de infecção que está descrito na Tabela 4.

TABELA 4: TEMPO, EM DIAS APÓS A INOCULAÇÃO, DO APARECIMENTO DE ALTERAÇÕES NA MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO DOS ISOLADOS DE SÊMEN DE TOUROS NATURALMENTE INFECTADOS.

Achados no cultivo/Isolados	N07	N09	N10	N11	Média
Poucos taquizoítas livres	30	14	14	25	21
Células soltas	25	25	30	14	24
Refringência do tapete celular	30	30	34	25	30
Muitos taquizoítas livres	30	30	38	25	31
Efeito citopático	34	30	38	25	32
Taquizoítas em células soltas	34	34	38	30	34
Destruição total da monocamada	36	34	38	30	35

O primeiro isolado foi da amostra N11, que iniciou com o aumento das células soltas aos 14 dias p.i., como ilustrado na Figura 3-B; refringência do tapete celular, efeito citopático e muitos taquizoítas livres aos 25 dias p.i., como ilustrado na Figura 3-C; formas taquizoítas em células soltas e destruição total da monocamada aos 30 dias p.i., como na ilustrado na Figura 3-D.

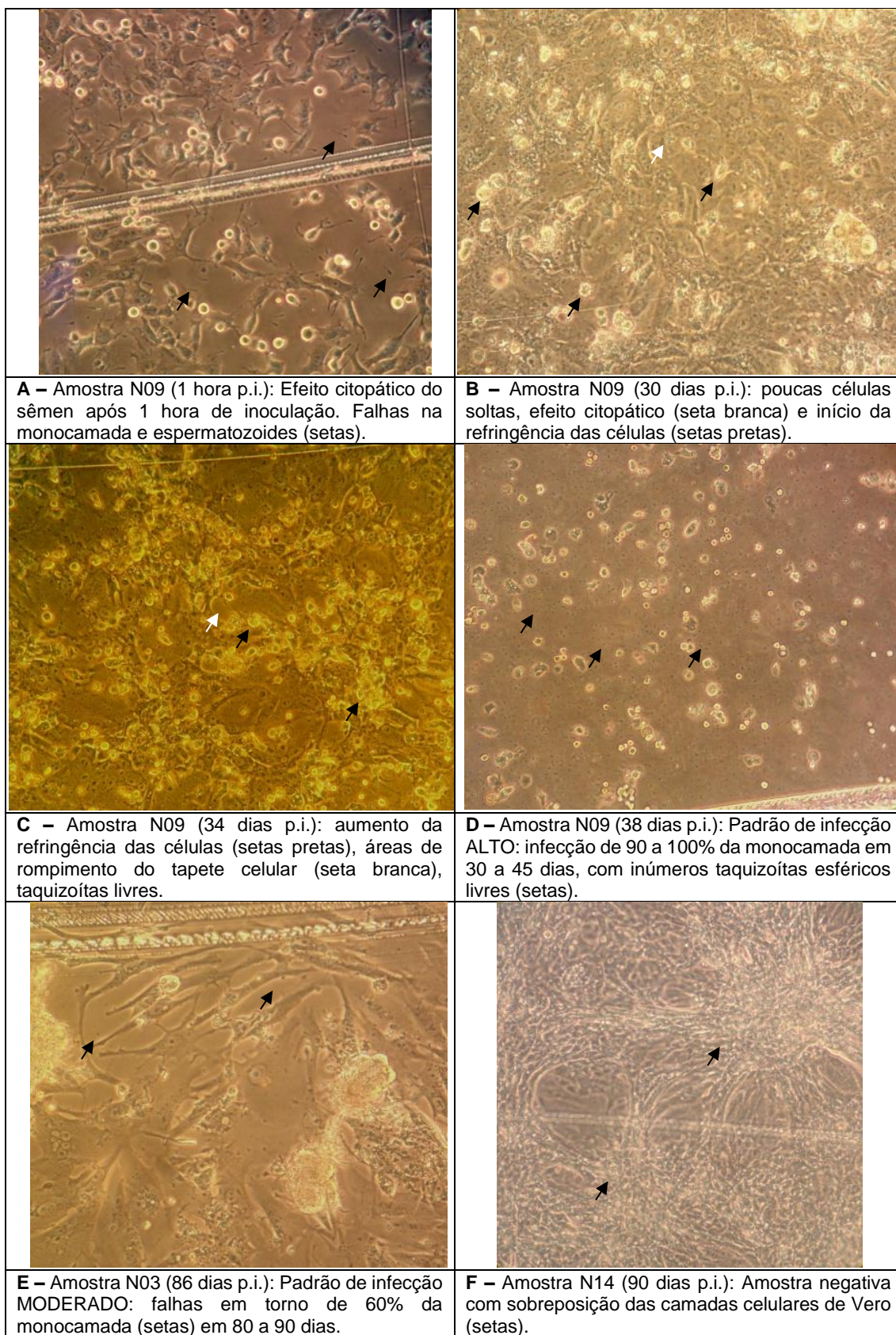


Figura 3: Padrão de infecção de *N. caninum* e *T. gondii* no cultivo celular a partir de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural, oriundos da Mesorregião Centro-Oriental do Paraná, soropositivos para *N. caninum* e *T. gondii* (A, B, C, D, E). F: Amostra negativa no cultivo celular de sêmen de touro.

Discussão

Neospora caninum

No presente estudo o DNA de *N. caninum* não foi identificado no sêmen de touros soropositivos destinados a reprodução em monta natural, o que concorda com o encontrado por Staubli *et al.* (2006), na Suíça, em que todas as amostras de sêmen de 20 touros soropositivos para *N. caninum* foram negativas na *nested*-PCR. Este fato pode ser explicado pela sua eliminação intermitente e baixa concentração, como em Serrano-Martinez *et al.* (2007a) que verificaram a concentração de 0,1 a 14,5 parasitas/mL (média de seis) em sêmen fresco de touros experimentalmente infectados por *N. caninum*, por *real time*-PCR. Ferre *et al.* (2008) encontraram que o máximo de taquizoítas foi de 15,6/mL em sêmen de touros reinfetados experimentalmente, sugerindo que existam aproximadamente 200 taquizoítas por ejaculado. Outros autores, por outro lado, detectaram o DNA de *N. caninum* em sêmen fresco (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; FERRE *et al.*, 2005; JOZANI *et al.*, 2012; SHARIFZADEH *et al.*, 2012) e sêmen congelado (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004B; SHARIFZADEH *et al.*, 2012; DOOSTI *et al.*, 2015) de touros soropositivos, naturalmente infectados, por meio da *nested*-PCR e PCR convencional. O DNA de *N. caninum* foi recentemente detectado em sêmen de cães (3/5) naturalmente infectados no Estado do Paraná (KOCH, 2014).

Pituco *et al.* (2005) também encontraram dificuldades em detectar o DNA de *N. caninum* em sêmen de touros no Brasil. Estes autores não obtiveram amostras positivas utilizando a PCR convencional para detecção de DNA de *N. caninum* em 1.124 partidas de sêmen fresco de cerca de 130 touros residentes em centrais de inseminação artificial, cuja soroprevalência era de 20%. Entretanto, quando estes autores utilizaram a *semi-nested* PCR (com limiar de detecção de 10 taquizoítas/mL) em 55 amostras da mesma origem, uma foi positiva.

Caetano-da-Silva *et al.* (2004b) não evidenciaram correlação significativa entre as amostras de sêmen de touro positivas na PCR e os títulos de anticorpos dos animais soropositivos na RIFI. A existência de touro soropositivo com PCR negativo na análise do sêmen foi relatada para outros agentes infecciosos como *Brucella melitensis* (AMIN *et al.*, 2001) ou *Herpes vírus bovino tipo I* (ROCHA *et al.*,

1998). Considerando que a PCR do sêmen íntegro foi negativa e a PCR do isolado foi positiva, a PCR do sêmen íntegro mostrou-se menos sensível se comparada ao uso do cultivo celular do sêmen como método diagnóstico, pois por este método, foi possível o isolamento de *N. caninum* nas amostras de sêmen de touros soropositivos (RIFI), mas que eram negativas na PCR do sêmen íntegro.

Este é o primeiro relato de isolamento de *N. caninum* em sêmen de touros naturalmente infectados oriundos de uma propriedade com abortos endêmicos. Outros autores não conseguiram o isolamento de *N. caninum* viável a partir de amostras positivas (*nested*-PCR) de sêmen fresco de touro por meio do bioensaio com camundongos (*BALB/c nu/nu*) (SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007A; FERRE *et al.*, 2008). Segundo estes autores, o insucesso do isolamento foi atribuído a diversas causas, tais como os efeitos tóxicos do sêmen bovino, não permitindo o inóculo de mais de 400 µL de sêmen fresco nos camundongos. Aqueles autores estimaram que com base na carga parasitária detectada nas amostras positivas, o número de parasitas em 400 µL de sêmen fresco bovino foi de aproximadamente quatro taquizoítas. Os efeitos tóxicos do sêmen também foram observados neste estudo, pois se utilizou 500 µL de sêmen na primeira tentativa de isolamento, o que destruiu completamente a monocamada de células Vero. Para reduzir esses efeitos, utilizou-se uma fração ainda menor de sêmen fresco (100 a 150 µL), alíquota na qual, apesar de pequena, ainda causou falhas na monocamada por seus efeitos tóxicos, mas permitiu o isolamento do parasita.

Da mesma forma como no presente estudo, Koch (2014) isolou *N. caninum* a partir de amostras de sêmen de cão, por cultivo celular, no Estado do Paraná. Outros isolados de *N. caninum* em bovinos já foram realizados a partir de fetos bovinos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004) e de um bezerro com sinais neurológicos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003) procedentes de rebanhos com histórico de abortamentos endêmicos no Estado do Paraná. Em seu estudo, Locatelli-Dittrich (2002) observou que para o isolamento de *N. caninum*, a técnica do cultivo celular apresentou melhores resultados que o isolamento em camundongos Swiss Webster e gerbis imunocompetentes.

As análises da PCR das amostras isoladas de sêmen de touro foram positivas para a região NC-5, mas não para a região ITS1 do DNA de *N. caninum*.

Outros autores também observaram a baixa concordância na amplificação das duas sequências na mesma amostra (JENKINS *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2009; TRUPPEL *et al.*, 2010), sendo a região NC-5 com maior sensibilidade, assim como no presente estudo. Truppel (2009) sugere que a hibridização dos iniciadores para a região NC-5 possa apresentar maior nível de estringência e, portanto, de maior especificidade de ligação se comparada à região ITS1. Este autor também acredita que a sensibilidade da PCR para cada teste pode variar devido à existência de menor ou maior número de cópias de cada sequência, e decorrer da ocorrência de determinadas variabilidades genotípicas nas sequências de DNA ribossomal de ITS1 e no DNA de NC-5 de *N. caninum*. Cabral *et al.* (2009) encontraram baixos valores entre o coeficiente *kappa* (índice de concordância entre testes) comparando-se a *nested*-PCR da região NC5 e da região ITS1 de *N. caninum* em fetos bovinos no Brasil, afirmando que essas técnicas são complementares na detecção do DNA do parasito.

Segundo Dubey e Schares (2006) os *primers* Np21/Np6 desenvolvidos por Yamage *et al.* (1996) tem nível de detecção de 1 taquizoíta/1 mg de tecido cerebral na PCR convencional, enquanto que os *primers* Np21plus/Np6plus desenvolvidos por Muller *et al.* (1996) tem um maior nível de detecção que corresponde a 1 a 10 taquizoítas. Dessa forma, este último par é atualmente mais utilizado devido a sua maior sensibilidade na detecção do DNA de *N. caninum* (OKEOMA *et al.*, 2004; MCINNIS *et al.*, 2006; FERROGLIO *et al.*, 2007; JENKINS *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2009; ROMANO *et al.*, 2009). O mesmo foi observado no presente estudo, no qual nenhuma amostra foi positiva para o primeiro par de *primer* e quatro isolados foram confirmados pelo segundo par de *primer*.

Os resultados positivos obtidos por PCR da região NC-5 do DNA *N. caninum* identificam os isolados, pois esta região é altamente específica para este protozoário, bastante conservada, apresenta múltiplas cópias no seu genoma, não sendo encontrada no genoma de *T. gondii*, *Sarcocystis spp.* ou *Hammondia spp.* (MULLER *et al.*, 1996; YAMAGE *et al.*, 1996).

O isolamento do *N. caninum* no presente estudo mostra que o parasita está viável no sêmen de touros naturalmente infectados. Entretanto, os achados não comprovam a sua transmissão venérea. Outros autores verificaram a transmissão venérea de *N. caninum* por meio da soroconversão de novilhas

inseminadas com sêmen fresco infectado por taquizoítas, mas apenas em concentrações elevadas (5×10^4). Não houve soroconversão ou detecção de DNA em embriões ou bezerros nestes estudos (SERRANO *et al.*, 2006; SERRANO-MARTINEZ *et al.*, 2007B). Entretanto, não foi possível observar a transmissão venérea em vacas inseminadas com sêmen congelado contaminado com $1,63 \times 10^7$ taquizoítas de *N. caninum* (CANADA *et al.*, 2006) e nem em vacas cobertas em monta natural por touros infectados com 1×10^8 taquizoítas (OSORO *et al.*, 2009).

Os estudos experimentais sugerem que a via de transmissão venérea talvez seja possível, mas não comprovam se ela ocorre em condições naturais. Estudos devem ser realizados para verificar se a viabilidade do *N. caninum* no sêmen de touros naturalmente infectados é capaz de acarretar a transmissão venérea pela monta natural.

Toxoplasma gondii

Não há relatos de detecção de DNA de *T. gondii* em sêmen de touros naturalmente infectados, o que corrobora com os achados do presente estudo, que não evidenciou DNA de *T. gondii* em sêmen fresco de touros soropositivos. Entretanto, Scarpelli *et al.* (2009) detectaram este parasita em sêmen de touros experimentalmente infectados por *T. gondii*, por PCR e por bioensaio em camundongos.

O isolamento de *T. gondii* viável a partir de amostras de sêmen de touros foi possível no presente estudo pela técnica do cultivo celular. Em touros experimentalmente infectados, Scarpelli *et al.* (2009) também obtiveram sucesso no isolamento de *T. gondii*, mas pela técnica de bioensaio em camundongos.

Apesar de necessitar de maior tempo para obtenção do resultado, o cultivo celular apresentou maior sensibilidade na detecção do *T. gondii* nas amostras do sêmen que o PCR. Dehkordi *et al.* (2013) também relataram a maior sensibilidade da detecção de *T. gondii* por isolamento em cultivo celular (100%) em amostras de leite frente à sensibilidade de 80,3% da PCR. O mesmo foi observado por Scarpelli *et al.* (2009) que ao isolarem *T. gondii* de órgão de bovinos experimentalmente infectados, verificaram que a PCR teve sensibilidade de 23%, menor que a sensibilidade do bioensaio em camundongos, que foi de 50%.

Houve concordância parcial entre os resultados obtidos nas técnicas de PCR utilizadas neste estudo com relação às amostras isoladas no cultivo celular. Apenas uma amostra (N11) foi positiva na PCR tendo como alvo o fragmento de 529 pb que se repete de 200 a 300 vezes no DNA de *T. gondii*. Homan *et al.* (2000) estimaram que o nível de detecção deste *primer* fosse a partir de 10^2 a 10^4 taquizoítas/amostra. Comparando-se com a *nested*-PCR da região B1 do DNA ribossomal de *T. gondii*, três amostras foram positivas (N07, N10 e N11). Em relação a PCR da região ITS1 do rDNA de *T. gondii*, outras três amostras foram positivas (N09, N10, N11).

Apenas a amostra N11 foi positiva nas três técnicas utilizadas, com taxa de concordância de 25% (1/4). A *nested*-PCR da região B1 e a PCR da região ITS1 do rDNA de *T. gondii*, concordaram em 50% (2/4) nas análises das amostras N10 e N11. Tendo como critério de positividade a detecção de DNA de *T. gondii* em pelo menos uma das reações, a prevalência da infecção foi de 36,4% (4/11) em sêmen de touros naturalmente infectados. Truppel (2009) também observou concordância parcial entre a PCR da região B1 e da região ITS1 do *T. gondii* no exame de tecidos de capivaras no Paraná. Sendo que cada par de *primer* utilizado objetivou uma região diferente do genoma de *T. gondii*, estas divergências podem ser explicadas pelo variado número em que as sequências estão repetidas no DNA, como já discutido no tópico de *N. caninum* e são inerentes à PCR. Dessa forma, sendo a amostra N11 positiva para as três regiões, não há dúvida que se trata de isolado de *T. gondii* em sêmen de touro naturalmente infectado.

Deve-se levar em conta o grande potencial para transmissão venérea de *T. gondii* em bovinos, uma vez que esta via já foi comprovada em estudos experimentais em coelhos (LIU *et al.*, 2006A), ovelhas (DE MORAES *et al.*, 2010) e cabras (WANDERLEY *et al.*, 2013). O isolamento do *T. gondii* no presente estudo mostra que o parasita está viável no sêmen de touros naturalmente infectados. Entretanto, os achados não comprovam a sua transmissão venérea e mais estudos devem ser realizados neste sentido.

Coinfecção de *N. caninum* e *T. gondii*

A pesquisa de anticorpos evidenciou uma baixa taxa de coinfecção (2/36) dos touros do rebanho no T1, similar ao encontrado por outros estudos

sorológicos em bovinos nos quais a coinfecção variou de 1 a 3% (OGAWA *et al.*, 2005; KONNAI *et al.*, 2008; PANADERO *et al.*, 2010). Hill e Dubey (2002) acreditam que é importante o emprego de amostras coletadas com semanas de intervalo para determinar a soroconversão, indicativo de infecção recente. Dessa forma a análise da sorologia dos quinze touros coletados no T1 e no T2 mostra uma coinfecção mais apurada que a análise apenas dos 36 touros no T1, evidenciando uma taxa de coinfecção de 53,3% (8/15), muito mais elevada que o encontrado pelos autores citados anteriormente.

Nas análises da PCR do cultivo celular do sêmen dos touros do rebanho estudado, a taxa de coinfecção foi de 36,4% (4/11). Taxas menores de coinfecção foram encontradas por outros autores. Hughes *et al.* (2006) relataram coinfecção de 12,2% (9/74) em tecidos de cordeiros por PCR. No Paraná, Truppel (2009) observou 3,8% (1/26) de coinfecção em tecidos de capivaras e Koch (2014) observou 9% (1/11) de coinfecção em sêmen de cão. Moreno *et al.* (2012) pesquisaram DNA de *N. caninum* e de *T. gondii* em cérebro de fetos ovinos e caprinos abortados na Espanha. A taxa de infecção em fetos ovinos foi de 6,8% (5/74) para o *N. caninum* e de 5,4% (4/74) para o *T. gondii*. Nos fetos caprinos, a taxa foi de 11,5% (3/26) e 3,8% (1/26), respectivamente. Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, os autores verificaram que a coinfecção ocorreu em apenas um feto ovino (1,4%).

A coinfecção foi comprovada por três técnicas de PCR em quatro isolados de sêmen de touro, descritas anteriormente. Entretanto, observou-se que a PCR da região ITS1, que é comum aos dois protozoários, foi mais sensível para *T. gondii* que para *N. caninum*. Dentre as nove amostras isoladas no cultivo celular, três foram positivas para *T. gondii* e todas foram negativas para *N. caninum* na PCR da região ITS1 destes parasitas. Homan *et al.* (1997) analisando as sequências de ITS1 de 20 isolados de *T. gondii* identificaram 100% de similaridade entre todas as linhagens. Entretanto, a região ITS1 de *N. caninum* apresentou uma divergência de 22% dos nucleotídeos, o que, segundo os autores, providencia um bom marcador molecular na distinção entre *T. gondii* e *N. caninum* (HOMAN *et al.*, 1997; GONDIM *et al.*, 2004A), porém não foram encontrados estudos do uso dessa técnica em amostras mistas.

Padrão de infecção no cultivo celular (in vitro) dos isolados mistos de N. caninum e T. gondii a partir de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural

LEI *et al.* (2005), observaram que em 60 minutos ocorre a adesão e invasão de *Neospora caninum* (cepa NC-1) e *Toxoplasma gondii* (cepa RH) nas células hospedeiras (Vero). Apesar dos efeitos tóxicos do sêmen observado no presente estudo, os parasitas presentes nas amostras inoculadas foram capazes de penetrar nas células Vero durante o pouco período de inoculação.

Um estudo *in vitro* com as cepas referências NC-1 (*Neospora caninum*) e RH (*T. gondii*) em cultivo com células fibroblásticas humanas observou que a taxa de penetração de *N. caninum* na célula hospedeira é 3,2 vezes maior que *T. gondii* na primeira hora e 2,9 vezes maior na terceira hora pós-inoculação (SUNDERMANN e ESTRIDGE, 1999). No mesmo trabalho, observou-se que o período do “descanso” que ocorre logo após a penetração e antes da multiplicação exponencial, foi de 8-10 horas para a cepa RH e de 10-12 horas para NC-1. Após esse período o RH multiplicou-se muito mais rápido que o NC-1 e o tempo entre gerações do primeiro foi de 8-10 horas e de 14-15 horas para o segundo.

Quando as cepas RH e o NC-1 foram cultivados em quantidade iguais no mesmo frasco, em competição por espaço e nutrientes, não houve diferença significativa na taxa de replicação, mas a partir do dia 4 p.i. a razão RH:NC-1 mudou de 50:50 para 70:30 e a razão seguiu mudando em favor do RH, mas as mudanças foram menos marcantes após a primeira e segunda passagem. Com 23 dias p.i. a razão era 97 RH: 3 NC-1. Essa razão mudou um pouco após o dia 31 p.i., mas o experimento foi finalizado (SUNDERMANN e ESTRIDGE, 1999).

No presente estudo, não foi possível identificar quais efeitos são referentes ao *N. caninum* ou ao *T. gondii* isoladamente, pois a quantificação dos parasitas previamente a inoculação não foi realizada e as análises da PCR do sêmen integro foram negativas, impossibilitando correlacionar estes dados. O desafio nessas amostras mistas será manter os isolados com os dois agentes viáveis ao longo das passagens em cultivo uma vez que o *T. gondii* poderá predominar devido a sua maior taxa de multiplicação.

Conclusões

Touros naturalmente infectados e que eliminam *N. caninum* e *T. gondii* viáveis no sêmen, tem títulos de anticorpos de 1:50 a 1:200. O isolamento *in vitro*, em cultivo celular, foi viável e eficaz para a obtenção de *N. caninum* e *T. gondii* em amostras de sêmen de touros naturalmente infectados. O cultivo celular do sêmen foi mais sensível na detecção dos parasitas que a PCR do sêmen integro.

A PCR com os primers Np21/Np6 não apresentou sensibilidade para a detecção do DNA de *N. caninum* nos isolados de sêmen, o que só foi possível com o uso dos primers Np21plus/Np6plus. O uso da *nested*-PCR da região B1 foi mais sensível na detecção de *T. gondii* que a PCR convencional do fragmento de 529 pb que se repete de 200 a 300 vezes no DNA de *T. gondii* nas amostras dos isolados de sêmen de touros.

Os resultados comprovam que o *T. gondii* e o *N. caninum* são eliminados viáveis no sêmen de touros naturalmente infectados, sugerindo uma possibilidade de infecção pela via venérea dos parasitas, que ainda precisa ser elucidada. A coinfecção e a eliminação simultânea dos dois agentes viáveis no sêmen de touros são possíveis.

Perspectivas

Estudos devem ser realizados para verificar a importância da viabilidade do *N. caninum* e *T. gondii* no sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural e seu impacto na manutenção e disseminação destes agentes nos rebanhos comerciais. Para tal, faz-se necessário:

- Desenvolver técnicas para separar cepas mistas de *N. caninum* e *T. gondii* nos isolados de sêmen;
- Caracterizar, por meio da genotipagem e sequenciamento, as cepas isoladas de amostras de sêmen de touros destinados a reprodução em monta natural;
- Elucidar a virulência das cepas isoladas de sêmen de touros por bioensaio em camundongos;
- Avaliar a possibilidade da transmissão venérea dos parasitas em condições naturais nos bovinos.

Referências bibliográficas

AMIN, A. S.; HAMDY, M. E.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Vet Microbiol**, v. 83, n. 1, p. 37-44, Oct 22 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524164> >. Acesso em: 24/08/14.

ARANTES, T. P. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Exp Parasitol**, v. 123, n. 2, p. 190-4, Oct 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622353> >. Acesso em: 13/04/14.

BEZERRA, M. J. G. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 989-991, 2013. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000800007&nrm=iso >. Acesso em: 13/04/14.

BLEWETT, D. A. *et al.* Toxoplasmosis in rams: possible significance of venereal transmission. **Vet Rec**, v. 111, n. 4, p. 73-5, Jul 24 1982.

BURG, J. L. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 8, p. 1787-92, Aug 1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2768467> >. Acesso em: 10/02/15.

CABRAL, A. D. *et al.* Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612009000400003&nrm=iso >. Acesso em: 10/02/15.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 19-24, Sep 20 2004a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350658> >. Acesso em: 05/05/13.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1329-36, Oct 1 2004b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325558> >. Acesso em: 05/05/13.

CANADA, N. *et al.* Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 139, n. 1-3, p. 109-14, Jun 30 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542775> >. Acesso em: 05/05/13.

CARVALHO-PATRICIO, M. A. *et al.* *Neospora*--DNA prevalence in rabies-negative cattle with neurological disorders. **Vet Rec**, v. 172, n. 9, p. 238, Mar 2

2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322543> >. Acesso em: 05/05/13.

DE MORAES, É. P. B. X. *et al.* Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 318-322, 6/24/ 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710000981> >. Acesso em: 20/05/14.

DEHKORDI, F. S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathog Dis**, v. 10, n. 2, p. 120-5, Feb 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441913> >. Acesso em: 10/02/15.

DOOSTI, A. *et al.* Survey for the presence of *Neospora caninum* in frozen bull's semen samples by PCR assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 1, p. 7-12, 1// 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180814606186> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, May 1 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391851> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 382-387, 9/27/ 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711003566> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776427> >. Acesso em: 25/01/15.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 22, n. 3, p. 645-71, Nov 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071358> >. Acesso em: 25/01/14.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, Aug 31 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730126> >. Acesso em: 10/02/14.

_____. Neosporosis in animals--the last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, Aug 4 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704458> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-67, Apr 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428888> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **Am J Vet Res**, v. 41, n. 5, p. 794-5, May 1980.

ELFAHAL, A. M. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. **ISRN Vet Sci**, v. 2013, p. 895165, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171116> >. Acesso em: 25/01/15.

ELLIS, J. T. *et al.* Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1589-96, Oct 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608446> >. Acesso em: 10/02/15.

FAJARDO, H. V. *et al.* Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 191, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800302> >. Acesso em: 25/01/15.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-18, Mar 15 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725454> >. Acesso em: 05/05/13.

FERRE, I. *et al.* Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 905-11, Apr 15 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336895> >. Acesso em: 05/05/13.

FERROGLIO, E. *et al.* Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Vet Parasitol**, v. 148, n. 3-4, p. 346-9, Sep 30 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651897> >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J Parasitol**, v. 90, n. 1, p. 119-22, Feb 2004a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040677> >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 159-61, Feb 2004b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037103> >. Acesso em: 10/02/15.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present.

Infect Genet Evol, v. 13, n. 0, p. 133-50, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985682> >. Acesso em: 05/05/13.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 10, p. 634-40, Oct 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390281> >. Acesso em: 10/02/15.

HOMAN, W. L. *et al.* Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitol Res**, v. 83, n. 3, p. 285-9, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089727> >. Acesso em: 10/02/15.

HOMAN, W. L. *et al.* Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 1, p. 69-75, Jan 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675747> >. Acesso em: 10/02/15.

HUGHES, J. M. *et al.* The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 1, p. 29-36, Jan 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393351> >. Acesso em: 24/08/14.

HURTADO, A. *et al.* Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 17-27, 12/3/ 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170100526X> >. Acesso em: 10/02/15.

JENKINS, M. C. *et al.* *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 2, p. 161-5, Jan 31 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997474> >. Acesso em: 24/08/14.

JOZANI, R. J. *et al.* Detection of non-spermatozoal cells of *Neospora caninum* in fresh semen of naturally infected bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 2, p. 1034, 2012. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304679300008 >. Acesso em: 24/08/14.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 945-50, Jul 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149793> >. Acesso em: 24/08/14.

KOCH, M. d. O. **Isolamento in vitro de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados**. 2014. 94pp Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1884/36301> >. Acesso em: 10/02/15.

KONNAI, S. *et al.* A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with

abortion problems. **Acta Trop**, v. 105, n. 3, p. 269-73, Mar 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243149> >. Acesso em: 25/01/15.

LEI, Y.; DAVEY, M.; ELLIS, J. T. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro.

Parasitology, v. 131, n. 05, p. 583-590, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255816> >. Acesso em: 10/02/15.

LIU, S. G. *et al.* Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, n. 3, p. 166-70, Jun 2006a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094613> >. Acesso em: 24/08/14.

LIU, S. G. *et al.* Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with *Toxoplasma* tachyzoites. **Chin Med J (Engl)**, v. 119, n. 8, p. 701-4, Apr 20 2006b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635418> >. Acesso em: 24/08/14.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil**. 2002. 184 Tese (Doutor em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia, Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Vet Rec**, v. 153, n. 12, p. 366-7, Sep 20 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533770> >. Acesso em: 05/05/13.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004. Disponível em: < http://cbpv.com.br/rbpv/documentos/1332004/c133103_109.pdf >. Acesso em: 05/05/13.

LOPES, W. D. *et al.* Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected rams (*ovis aries*). **J Parasitol Res**, v. 2009, n. Article ID 602803, p. 6, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721328> >. Acesso em: 24/08/14.

MARTINEZ-GARCIA, F. *et al.* Protozoan infections in the male genital tract. **J Urol**, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 340-9, Aug 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683676> >. Acesso em: 24/08/14.

MASUDA, T. *et al.* Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 1-2, p. 130-3, Oct 21 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689194> >. Acesso em: 05/05/13.

MCINNES, L. M. *et al.* Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 207-213, 12/20/ 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706004304> >. Acesso em: 24/08/14.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001202204&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

MOORE, D. P. *et al.* The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Vet Parasitol**, v. 156, n. 3-4, p. 163-7, Oct 1 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691819> >. Acesso em: 25/01/15.

MORAES, É. P. B. X. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001100003&script=sci_arttext >. Acesso em: 05/05/13.

MORENO, B. *et al.* Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Vet Parasitol**, v. 187, n. 1-2, p. 312-8, Jun 8 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260901> >. Acesso em: 24/08/14.

MOURA, A. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 430-434, Oct 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007001000008 >. Acesso em: 05/05/13.

MULLER, N. *et al.* Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 11, p. 2850-2, Nov 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897199> >. Acesso em: 24/08/14.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312-316, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000300006&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

OKEOMA, C. M. *et al.* The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Vet Parasitol**, v. 122, n. 4, p. 307-15, Aug 6 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262009> >. Acesso em: 24/08/14.

ORTEGA-MORA, L. M. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 301-308, Nov 28 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637032> >. Acesso em: 05/05/13.

OSORO, K. *et al.* Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 639-42, Mar 1 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18962878> >. Acesso em: 23/05/14.

PANADERO, R. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Res Vet Sci**, v. 88, n. 1, p. 111-5, Feb 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482324> >. Acesso em: 25/01/15.

PARAMESWARAN, N. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild kangaroos using an ELISA. **Parasitol Int**, v. 58, n. 2, p. 161-5, Jun 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567231> >. Acesso em: 24/08/15.

PITUCO, E. M. *et al.* Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. 15 a 16 setembro 2005. p.39-41.

PLUGGE, N. F. *et al.* Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, n. 3, p. 202-6, Jul-Sep 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961748> >. Acesso em: 24/08/14.

PUJOL-RIQUE, M. *et al.* Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 857-62, Sep 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482297> >. Acesso em: 24/08/14.

ROCHA, M. A. *et al.* A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Vet Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 1-11, Aug 28 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9810617> >. Acesso em: 24/08/14.

ROMANO, A. *et al.* Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2009, p. 159-161, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708005438> >. Acesso em: 28/02/15.

SANTANA, L. F. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 3, p. 179-82, Jul-Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943023> >. Acesso em: 05/05/13.

SCARPELLI, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 1, p. 59-64, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000100009 >. Acesso em: 10/05/14.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v. 67, n. 6, p. 1175-84, Apr 1 2007a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316779> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 729-37, Mar 1 2007b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126895> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Vet Parasitol**, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, Feb 18 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288958> >. Acesso em: 05/05/13.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. PCR assay for detection of *Neospora caninum* in fresh and frozen semen specimens of Iranian bulls. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 6, p. 8, 2012. Disponível em: < <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.390.92&rep=rep1&type=pdf> >. Acesso em: 24/08/14.

STAUBLI, D. *et al.* Search for *Neospora caninum* DNA in bull semen using PCR. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 148, n. 9, p. 483-9, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024977> >. Acesso em: 24/08/14.

SUNDERMANN, C. A.; ESTRIDGE, B. H. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1725-32, Oct 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608460> >. Acesso em: 24/08/14.

SYED-HUSSAIN, S. S. *et al.* Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Vet Parasitol**, v. 197, n. 3-4, p. 534-42, Nov 8 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819894> >. Acesso em: 24/08/14.

TEALE, A. J.; BLEWETT, D. A.; MILLER, J. K. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. **Vet Rec**, v. 111, n. 3, p. 53-5, Jul 17 1982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7123822> >. Acesso em: 24/08/14.

TERPSIDIS, K. I. *et al.* *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 3, p. 238-41, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19063884> >. Acesso em: 05/05/13.

TRUPPEL, J. H. **Avaliação do parasitismo em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e sua atuação como hospedeiro intermediário de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***. 2009. 161 Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas e da Saúde). Departamento de Patologia Básica e Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/20675>>. Acesso em: 10/02/15.

TRUPPEL, J. H. *et al.* Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitol Int**, v. 59, n. 3, p. 376-9, Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470895> >. Acesso em: 24/08/14.

WANDERLEY, F. S. *et al.* Experimental vaginal infection of goats with semen contaminated with the "CPG" strain of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 99, n. 4, p. 610-3, Aug 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391103> >. Acesso em: 24/08/14.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. J., *et al* (Ed.). **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, 1990. p.315–322.

YAI, L. E. O. *et al.* Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 227-234, 2003. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962003000300010&nrm=iso >. Acesso em: 24/08/14.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **J Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 272-9, Apr 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604096> >. Acesso em: 24/08/14.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. **Vet Parasitol**, v. 142, n. 1-2, p. 71-7, Nov 30 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857319> >. Acesso em: 25/01/15.

ALBUQUERQUE, G. R. *et al.* Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle, state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 287-290, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000400003&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

AMIN, A. S.; HAMDY, M. E.; IBRAHIM, A. K. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. **Vet Microbiol**, v. 83, n. 1, p. 37-44, Oct 22 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524164> >. Acesso em: 24/08/14.

ANDREOTTI, R. *et al.* Association between seropositivity for *Neospora caninum* and reproductive performance of beef heifers in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 2, p. 119-23, Apr-Jun 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624350> >. Acesso em: 25/01/15.

ARANTES, T. P. *et al.* *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Exp Parasitol**, v. 123, n. 2, p. 190-4, Oct 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622353> >. Acesso em: 13/04/14.

BARLING, K. S. *et al.* Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. **J Am Vet Med Assoc**, v. 217, n. 9, p. 1356-60, Nov 1 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1356> >. Acesso em: 05/05/2013.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 9, p. 426-30, Sep 2003. Disponível em: < [http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X\(03\)00205-1.pdf](http://www.cell.com/trends/microbiology/pdf/S0966-842X(03)00205-1.pdf) >. Acesso em: 05/05/2013.

BEZERRA, M. J. G. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* em órgãos do sistema reprodutivo de carneiros naturalmente infectados no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 989-991, 2013. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000800007&nrm=iso >. Acesso em: 13/04/14.

BJERKAS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Z Parasitenkd**, v. 70, n. 2, p. 271-4, 1984.

BLEWETT, D. A. *et al.* Toxoplasmosis in rams: possible significance of venereal transmission. **Vet Rec**, v. 111, n. 4, p. 73-5, Jul 24 1982.

BURG, J. L. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 8, p. 1787-92, Aug 1989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2768467> >. Acesso em: 10/02/15.

CABRAL, A. D. *et al.* Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 14-19, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612009000400003&nrm=iso >. Acesso em: 10/02/15.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 19-24, Sep 20 2004a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350658> >. Acesso em: 05/05/2013.

CAETANO-DA-SILVA, A. *et al.* Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1329-36, Oct 1 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325558> >. Acesso em: 05/05/13.

CAMILLO, G. *et al.* Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352010000600033&nrm=iso >. Acesso em: 15/02/15.

CANADA, N. *et al.* Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 139, n. 1-3, p. 109-14, Jun 30 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542775> >. Acesso em: 05/05/13.

CARVALHO-PATRICIO, M. A. *et al.* *Neospora*--DNA prevalence in rabies-negative cattle with neurological disorders. **Vet Rec**, v. 172, n. 9, p. 238, Mar 2 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322543> >. Acesso em: 05/05/13.

CORBELLINI, L. G. *et al.* Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. **Prev Vet Med**, v. 74, n. 2-3, p. 130-41, May 17 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343669> >. Acesso em: 25/01/15.

COSTA, G. H. *et al.* *Toxoplasma gondii*: infection natural congenital in cattle and an experimental inoculation of gestating cows with oocysts. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 277-81, Jan 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20736009> >. Acesso em: 24/09/14.

DE MACEDO, M. F. *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21,

n. 1, p. 74-7, Jan-Mar 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534951> >. Acesso em: 25/08/14.

DE MORAES, É. P. B. X. *et al.* Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 318-322, 6/24/ 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710000981> >. Acesso em: 20/05/14.

DEHKORDI, F. S. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathog Dis**, v. 10, n. 2, p. 120-5, Feb 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441913> >. Acesso em: 10/02/15.

DOOSTI, A. *et al.* Survey for the presence of *Neospora caninum* in frozen bull's semen samples by PCR assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 1, p. 7-12, 1// 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180814606186> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 157, n. 3-4, p. 299-305, Nov 7 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804329> >. Acesso em: 24/08/14.

DUBEY, J. P. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 382-387, 9/27/ 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401711003566> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). **Vet Parasitol**, v. 201, n. 1-2, p. 150-3, Mar 17 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.032>>. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 192, n. 9, p. 1269-85, May 1 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391851> >. Acesso em: 10/02/15.

DUBEY, J. P. *et al.* *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. **J Parasitol**, v. 90, n. 4, p. 721-6, Aug 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359466> >. Acesso em: 24/08/14.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776427> >. Acesso em: 25/01/15.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 22, n. 3, p. 645-71, Nov 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071358> >. Acesso em: 25/01/14.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Vet Parasitol**, v. 140, n. 1-2, p. 1-34, Aug 31 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730126> >. Acesso em: 10/02/14.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Vet Parasitol**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, Aug 4 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704458> >. Acesso em: 05/05/2013.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 2, p. 323-67, Apr 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428888> >. Acesso em: 05/05/13.

DUBEY, J. P.; SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **Am J Vet Res**, v. 41, n. 5, p. 794-5, May 1980.

ELFAHAL, A. M. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Dairy Cattle with Reproductive Problems in Sudan. **ISRN Vet Sci**, v. 2013, p. 895165, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171116> >. Acesso em: 25/01/15.

ELLIS, J. T. *et al.* Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1589-96, Oct 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608446> >. Acesso em: 10/02/15.

FAJARDO, H. V. *et al.* Seroprevalence and risk factors of toxoplasmosis in cattle from extensive and semi-intensive rearing systems at Zona da Mata, Minas Gerais state, Southern Brazil. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 191, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800302> >. Acesso em: 25/01/15.

FERRE, I. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-18, Mar 15 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725454> >. Acesso em: 05/05/13.

FERRE, I. *et al.* Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 905-11, Apr 15 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336895> >. Acesso em: 05/05/13.

FERROGLIO, E. *et al.* Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. **Vet Parasitol**, v. 148, n. 3-4, p. 346-9, Sep 30 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651897> >. Acesso em: 10/02/15.

FRÖSSLING, J. *et al.* Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 3, p. 141-153, 3/20/2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587702002167> >. Acesso em: 10/02/15.

GARCIA-BOCANEGRA, I. *et al.* *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. **J Parasitol**, v. 99, n. 3, p. 438-40, Jun 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145484> >. Acesso em: 25/01/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 159-61, Feb 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037103> >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *et al.* Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **J Parasitol**, v. 90, n. 1, p. 119-22, Feb 2004a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040677> >. Acesso em: 10/02/15.

GONDIM, L. F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 6, p. 247-52, Jun 2006. Disponível em: < [http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922\(06\)00081-X.pdf](http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922(06)00081-X.pdf) >. Acesso em: 10/02/15.

GONZALEZ-WARLETA, M. *et al.* Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). **Parasitol Res**, v. 102, n. 2, p. 243-9, Jan 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17899194> >. Acesso em: 25/01/15.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. **Infect Genet Evol**, v. 13, n. 0, p. 133-50, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985682> >. Acesso em: 05/05/13.

GUIMARAES, J. S., Jr. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 124, n. 1-2, p. 1-8, Sep 20 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350656> >. Acesso em: 25/01/15.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 10, p. 634-40, Oct 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390281> >. Acesso em: 10/02/15.

HOMAN, W. L. *et al.* Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. **Parasitol Res**, v. 83, n. 3,

p. 285-9, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089727> >. Acesso em: 10/02/15.

HOMAN, W. L. *et al.* Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 1, p. 69-75, Jan 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10675747> >. Acesso em: 10/02/15.

HUGHES, J. M. *et al.* The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 1, p. 29-36, Jan 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16393351> >. Acesso em: 24/08/14.

HURTADO, A. *et al.* Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 17-27, 12/3/ 2001. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440170100526X> >. Acesso em: 10/02/15.

JENKINS, M. C. *et al.* *Neospora caninum* detected in feral rodents. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 2, p. 161-5, Jan 31 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997474> >. Acesso em: 24/08/14.

JOZANI, R. J. *et al.* Detection of non-spermatozoal cells of *Neospora caninum* in fresh semen of naturally infected bulls. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 2, p. 1034, 2012. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000304679300008 >. Acesso em: 24/08/14.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **Int J Parasitol**, v. 40, n. 8, p. 945-50, Jul 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149793> >. Acesso em: 24/08/14.

KOCH, M. d. O. **Isolamento in vitro de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados**. 2014. 94pp Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/1884/36301> >. Acesso em: 10/02/15.

KONNAI, S. *et al.* A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. **Acta Trop**, v. 105, n. 3, p. 269-73, Mar 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243149> >. Acesso em: 25/01/15.

LANGONI, H. *et al.* Avaliação sorológica para *Neospora caninum* em propriedades de bovinos leiteiros com alterações reprodutivas. **Vet. Zootec.**, v. 20, p. 124-130, 2013. Disponível em: < <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/646/439> >. Acesso em: 10/02/15.

LEI, Y.; DAVEY, M.; ELLIS, J. T. Attachment and invasion of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* to epithelial and fibroblast cell lines in vitro.

Parasitology, v. 131, n. 05, p. 583-590, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255816> >. Acesso em: 10/02/15.

LIU, S. G. *et al.* Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with *Toxoplasma tachyzoites*. **Chin Med J (Engl)**, v. 119, n. 8, p. 701-4, Apr 20 2006b. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635418> >. Acesso em: 24/08/14.

LIU, S. G. *et al.* Study on the transmission of *Toxoplasma gondii* by semen in rabbits. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, n. 3, p. 166-70, Jun 2006a. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17094613> >. Acesso em: 24/08/14.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Rev Bras**

Parasitol Vet, v. 17 Suppl 1, p. 191-6, Sep 2008. Disponível em: < <http://www.cbpv.org.br/rbpv/documentos/17supl.12008/Protozool001.pdf> >.

Acesso em: 25/01/15.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004. Disponível em: <

http://cbpv.com.br/rbpv/documentos/1332004/c133103_109.pdf >. Acesso em: 05/05/13.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Parana, southern Brazil. **Vet Rec**, v. 153, n. 12, p. 366-7, Sep 20 2003.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533770> >. Acesso em: 05/05/13.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. **J Parasitol**, v. 87, n. 6, p. 1493-4, Dec 2001.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780849> >. Acesso em: 10/05/14.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil**. 2002. 184 Tese (Doutor em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia, Pós Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LOPES, W. D. *et al.* Aspects of *Toxoplasma* infection on the reproductive system of experimentally infected rams (*ovis aries*). **J Parasitol Res**, v. 2009, n. Article ID 602803, p. 6, 2009. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721328> >. Acesso em: 24/08/14.

LOPES, W. D. *et al.* Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. **Vet Parasitol**, Jan 9 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.056> >. Acesso em: 05/05/13.

MARQUES, F. A. *et al.* *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). **Parasitol Res**, v. 108, n. 4, p. 1015-9, Apr 2011. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-010-2146-x> >. Acesso em: 10/05/14

MARSH, A. E. *et al.* Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 209, n. 11, p. 1907-13, Dec 1 1996. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/14262088_Neosporosis_as_a_cause_of_equine_protozoal_myeloencephalitis >. Acesso em: 10/02/15.

MARTINEZ-GARCIA, F. *et al.* Protozoan infections in the male genital tract. **J Urol**, v. 156, n. 2 Pt 1, p. 340-9, Aug 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683676> >. Acesso em: 24/08/14.

MASUDA, T. *et al.* Possibility of *Neospora caninum* infection by venereal transmission in CB-17 scid mice. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 1-2, p. 130-3, Oct 21 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689194> >. Acesso em: 05/05/13.

MCINNES, L. M. *et al.* Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 207-213, 12/20/ 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706004304> >. Acesso em: 24/08/14.

MEIRELLES, A. C. F. *et al.* Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2204-2209, 2014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014001202204&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

MELO, D. P. *et al.* Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 15, n. 3, p. 105-9, Jul-Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978474> >. Acesso em: 25/01/15.

MINEO, T. W. *et al.* Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in brazilian dairy herds with reproductive disorders. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 15, n. 4, p. 188-92, Oct-Dec 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196123> >. Acesso em: 25/01/15.

MINEO, T. W. *et al.* Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. **Vet Parasitol**, v. 182, n. 2-4, p. 352-5, Dec 15 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171100375X>>. Acesso em: 210/02/15.

MOORE, D. n. P. *et al.* Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. **Vet Parasitol**, v. 107, n. 4, p. 303-316, Aug 22 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702001292> >. Acesso em: 08/10/14.

MOORE, D. P. *et al.* The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. **Vet Parasitol**, v. 156, n. 3-4, p. 163-7, Oct 1 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691819> >. Acesso em: 25/01/15.

MORAES, É. P. B. X. *et al.* Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010001100003&script=sci_arttext >. Acesso em: 05/05/13.

MORENO, B. *et al.* Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. **Vet Parasitol**, v. 187, n. 1-2, p. 312-8, Jun 8 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260901> >. Acesso em: 24/08/14.

MOURA, A. B. *et al.* Detecção de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em bovinos de corte abatidos em Guarapuava, PR, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 94-99, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v15i2.14779> >. Acesso em: 24/08/14.

MOURA, A. B. *et al.* *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 430-434, Oct 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2007001000008 >. Acesso em: 05/05/13.

MULLER, N. *et al.* Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 11, p. 2850-2, Nov 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897199> >. Acesso em: 24/08/14.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **C R Seances Acad Sci.**, v. 148, p. 369–372, 1909.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **C R Seances Acad Sci.**, v. 147, p. 763–766, 1908.

OGAWA, L. *et al.* Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State,

Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 312-316, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352005000300006&nrm=iso >. Acesso em: 25/01/15.

OKEOMA, C. M. *et al.* The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. **Vet Parasitol**, v. 122, n. 4, p. 307-15, Aug 6 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15262009> >. Acesso em: 24/08/14.

ORTEGA-MORA, L. M. *et al.* Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Vet Parasitol**, v. 117, n. 4, p. 301-308, Nov 28 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14637032> >. Acesso em: 05/05/13.

OSHIRO, L. M. *et al.* Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 16, n. 3, p. 133-8, Jul-Sep 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18078599> >. Acesso em: 25/01/15.

OSORO, K. *et al.* Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 639-42, Mar 1 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18962878> >. Acesso em: 23/05/14.

OTRANTO, D. *et al.* Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. **Vet Parasitol**, v. 118, n. 1-2, p. 7-18, Dec 1 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651870> >. Acesso em: 05/03/15.

PABON, M. *et al.* Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 40-6, Jun 20 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467905> >. Acesso em: 25/01/15.

PANADERO, R. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). **Res Vet Sci**, v. 88, n. 1, p. 111-5, Feb 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482324> >. Acesso em: 25/01/15.

PARAMESWARAN, N. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild kangaroos using an ELISA. **Parasitol Int**, v. 58, n. 2, p. 161-5, Jun 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567231> >. Acesso em: 24/08/15.

PENA, H. F. *et al.* Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 147, n. 1-2, p. 61-6, Jun 20 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451882> >. Acesso em: 24/08/14.

PENA, H. F. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 1, p. 58-67, Aug 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289158> >. Acesso em: 24/08/14.

PITUCO, E. M. *et al.* Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. I Fórum Brasileiro de Estudos sobre *Neospora caninum*, 2005, São Paulo. 15 a 16 setembro 2005. p.39-41.

PLUGGE, N. F. *et al.* Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 20, n. 3, p. 202-6, Jul-Sep 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961748> >. Acesso em: 24/08/14.

PUJOL-RIQUE, M. *et al.* Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. **J Med Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 857-62, Sep 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10482297> >. Acesso em: 24/08/14.

QIU, J. H. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle and dairy cattle in northeast China. **Foodborne Pathog Dis**, v. 9, n. 7, p. 579-82, Jul 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22545962> >. Acesso em: 25/01/15.

ROCHA, M. A. *et al.* A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Vet Microbiol**, v. 63, n. 1, p. 1-11, Aug 28 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9810617> >. Acesso em: 24/08/14.

ROMANO, A. *et al.* Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2009, p. 159-161, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401708005438> >. Acesso em: 28/02/15.

SANTANA, L. F. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in the reproductive system of male goats. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 3, p. 179-82, Jul-Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943023> >. Acesso em: 05/05/13.

SANTOS, R. R. *et al.* Quantification of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cows in Minas Gerais, Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 21, n. 3, p. 294-7, Jul-Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070443> >. Acesso em: 25/01/15.

SANTOS, S. L. *et al.* Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. **Parasitol Res**, v. 106, n. 2, p. 457-61, Jan 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19943064> >. Acesso em: 24/08/14.

SANTOS, T. R. *et al.* Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 161, n. 3-4, p. 324-6, May 12 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232473> >. Acesso em: 25/01/15.

SCARPELLI, L. *et al.* *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 1, p. 59-64, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000100009 >. Acesso em: 10/05/14.

SERRANO, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Vet Parasitol**, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, Feb 18 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288958> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v. 67, n. 6, p. 1175-84, Apr 1 2007a. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316779> >. Acesso em: 05/05/13.

SERRANO-MARTINEZ, E. *et al.* Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 729-37, Mar 1 2007b. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126895> >. Acesso em: 05/05/13.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P. G. PCR assay for detection of *Neospora caninum* in fresh and frozen semen specimens of Iranian bulls. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 6, p. 8, 2012. Disponível em: < <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.390.92&rep=rep1&type=pdf> >. Acesso em: 24/08/14.

SIQUEIRA, D. B. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild marsupials and rodents from the Atlantic forest of Pernambuco state, northeastern region, Brazil. **J Parasitol**, v. 99, n. 6, p. 1140-3, Dec 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829204> >. Acesso em: 24/08/14.

SPLENDRE, A. Un nuovo parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

STAUBLI, D. *et al.* Search for *Neospora caninum* DNA in bull semen using PCR. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 148, n. 9, p. 483-9, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024977> >. Acesso em: 24/08/14.

SUNDERMANN, C. A.; ESTRIDGE, B. H. Growth of and competition between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 10, p. 1725-32, Oct 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608460> >. Acesso em: 24/08/14.

SYED-HUSSAIN, S. S. *et al.* Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Vet Parasitol**, v. 197, n. 3-4, p. 534-42, Nov 8 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819894> >. Acesso em: 24/08/14.

TEALE, A. J.; BLEWETT, D. A.; MILLER, J. K. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: the clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. **Vet Rec**, v. 111, n. 3, p. 53-5, Jul 17 1982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7123822> >. Acesso em: 24/08/14.

TERPSIDIS, K. I. *et al.* *Toxoplasma gondii*: reproductive parameters in experimentally infected male rats. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 3, p. 238-41, Mar 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19063884> >. Acesso em: 05/05/13.

TRUPPEL, J. H. *et al.* Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. **Parasitol Int**, v. 59, n. 3, p. 376-9, Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470895> >. Acesso em: 24/08/14.

TRUPPEL, J. H. **Avaliação do parasitismo em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e sua atuação como hospedeiro intermediário de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***. 2009. 161 Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas e da Saúde). Departamento de Patologia Básica e Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/20675>>. Acesso em: 10/02/15.

VITALIANO, S. N. *et al.* Serologic evidence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds and mammals from southeast Brazil. **J Zoo Wildl Med**, v. 45, n. 1, p. 197-9, Mar 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24712186> >. Acesso em: 24/02/15.

WANDERLEY, F. S. *et al.* Experimental vaginal infection of goats with semen contaminated with the "CPG" strain of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 99, n. 4, p. 610-3, Aug 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391103> >. Acesso em: 24/08/14.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895-901, 02/13 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704023/>>. Acesso em: 10/02/15.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. J., *et al* (Ed.). **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, 1990. p.315–322.

XU, M. J. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in dairy cows in subtropical southern China. **Parasitology**, v. 139, n.

11, p. 1425-8, Sep 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22717118> >. Acesso em: 25/01/15.

YAI, L. E. *et al.* Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Vet Parasitol**, v. 162, n. 3-4, p. 332-7, Jun 10 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375864> >. Acesso em: 24/08/14.

YAI, L. E. O. *et al.* Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 227-234, 2003. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962003000300010&nrm=iso >. Acesso em: 24/08/14.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **J Parasitol**, v. 82, n. 2, p. 272-9, Apr 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604096> >. Acesso em: 24/08/14.

YANIZ, J. L. *et al.* Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 4, p. 699-705, Aug 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210662> >. Acesso em: 25/01/15.

YU, J. *et al.* Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 1, p. 79-85, Jan 19 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17010521> >. Acesso em: 25/01/15.

ZHOU, D. H. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in dairy cattle in southern China. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 48, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401571> >. Acesso em: 25/01/15.